

MÁRCIA MARIA COSTA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE NO BRAÇO CURTO DO
CROMOSSOMO 3 (3p) EM PACIENTES COM CARCINOMA MAMÁRIO
ESPORÁDICO**

**CURITIBA
2008**

MÁRCIA MARIA COSTA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE NO BRAÇO CURTO DO
CROMOSSOMO 3 (3p) EM PACIENTES COM CARCINOMA MAMÁRIO
ESPORÁDICO**

Dissertação apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas com Ênfase em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas com Ênfase em Genética.

Orientador: Prof^o Dr. Iglénir João Cavalli

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Enilze M.S.F. Ribeiro

**CURITIBA
2008**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética



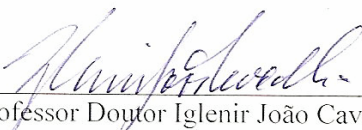
PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a que se submeteu **MÁRCIA MARIA COSTA DE OLIVEIRA**, para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira a candidata o conceito "A".


Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2008.

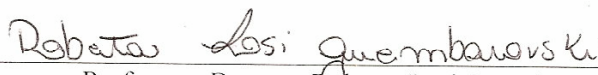
Banca Examinadora:



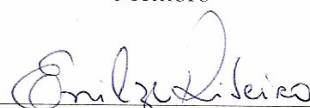
Professor Doutor Iglenir João Cavalli
Orientador e Presidente



Professora Doutora Luciane Regina Cavalli
Membro *ad hoc*



Professora Doutora Roberta Losi Guembarovski
Membro



Professora Doutora Enilze de S. F. Ribeiro
Membro

Visto:



Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética
Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1587/1562 – Fax (41) 3266-2042 – pggene@ufpr.br
www.ufpr.br

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me incentivaram e me apoiaram na busca por meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, a quem admiro muito, pela excelente orientação e dedicação, pela paciência e amizade, e sobretudo por me ensinar valores que vão além dos conhecimentos científicos e que contribuíram muito para a minha formação como pesquisadora, professora e principalmente como pessoa. Por nos ensinar a ética e o amor pela pesquisa.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, que sempre foi uma grande orientadora, e também contribuiu muito para a minha formação profissional e pessoal durante todo esse tempo de convivência, por estar sempre acessível e disposta a ensinar, e pela preocupação e carinho que sempre dedica aos seus alunos.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética Humana pela ajuda e pelos momentos de descontração e alegria no laboratório. À Dr. Roberta Losi Guembarovski pelo auxílio na parte técnica deste trabalho, pelas correções e por estar sempre disposta a ajudar.

À Dr. Luciane Cavalli, pelas correções e sugestões que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Às queridas amigas do Laboratório de Citogenética do HC: Ana, Tamara, Aglaci e Rose, pela atenção e carinho com que me receberam, e por tudo que me ensinaram na citogenética.

A todos os indivíduos e instituições envolvidos nesta pesquisa, sobretudo ao Dr. Rubens Lima e aos funcionários da Oncoclínica de Curitiba, em especial à Claudete, pela sua grande dedicação, ao Hospital de Clínicas, Hospital Nossa Senhora das Graças e à Universidade Federal do Paraná, funcionários e amigos do Departamento de Genética. A todos os professores do curso de pós-graduação por tudo que aprendi e pelos momentos de confraternização e amizade.

Aos grandes amigos que conquistei durante o mestrado, pelos ótimos momentos que passamos juntos, momentos de estudos, de trabalho, e principalmente de amizade que já me fazem sentir saudades da nossa convivência diária.

Ao Rafael, por todo amor e companheirismo, por me ensinar tanto a cada dia e ser uma pessoa tão importante na minha vida.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação imensuráveis, pelo esforço e apoio para que eu sempre pudesse me dedicar aos estudos e ir atrás dos meus sonhos. Aos meus irmãos pelo amor e amizade. A toda a minha família pelo enorme carinho.

Aos meus grandes amigos que estão sempre presentes em minha vida.

E a Deus pela saúde, disposição e pela vida.

RESUMO

A carcinogênese mamária é caracterizada por uma elevada heterogeneidade genética, o que reflete na sua diversidade clínica e histopatológica. Nestes tumores perdas alélicas são frequentes e comumente envolvem regiões que contêm genes supressores tumorais (GSTs), como por exemplo a região do braço curto do cromossomo 3. Neste estudo, analisamos a perda de heterozigose (LOH) e a instabilidade de microssatélite (MI) em 142 pacientes com tumor primário de mama utilizando sete marcadores microssatélites localizados em 3p: D3S1307 (3p26.3), D3S1263 (3p25.3), D3S1286 (3p24.3), D3S1581 (3p21.3), D3S1300 (3p14.2, intragênico do *FHIT*), D3S1079 (3p14.2) e D3S1274 (3p12.3, intragênico do *ROBO1*). LOH e MI foram analisados pelo software Fragment Profiler (MegaBACE 1000 *Applied Biosystems*) após amplificação por PCR com os marcadores microssatélites em amostras de DNA obtidos de tecido tumoral congelado e sangue periférico (amostra normal) das pacientes. A análise de variância e o teste do Qui-Quadrado foram utilizados para analisar os resultados de LOH e os parâmetros histopatológicos: tamanho e grau de diferenciação tumoral, envolvimento de linfonodos, presença dos receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), e amplificação do oncogene *ERBB2*. A LOH foi observada em todos os locos analisados, variando de 19,7% (marcador D3S1263) a 45,9% (marcador D3S1307). Para um dos marcadores analisados, D3S1274, a presença/ausência de LOH e a positividade/negatividade para o RE não se apresentaram homoganeamente distribuídos ($\chi^2_1=8,12$; $P<0,01$). Da mesma forma, foi observada uma frequência elevada e significativa entre a LOH para o marcador D3S1274 em carcinomas lobulares (75%) quando comparada aos carcinomas ductais (31,8%) e tipos histológicos raros (33%) ($\chi^2_2=5,42$; $P<0,05$). A instabilidade de microssatélite (MI) foi observada em seis marcadores, com frequências variando de 1,9% (marcador D3S1581) a 5,4% (marcador D3S1300). Com base nos nossos resultados, concluímos que as sub-regiões analisadas contêm genes supressores tumorais cuja inativação pode estar envolvida na carcinogênese mamária. A alta frequência de LOH em 3p12.3 encontrada em carcinomas lobulares precisa ser investigada em amostras de tamanho mais consistente para associarmos o envolvimento desta região (e possivelmente do gene *ROBO1*) no desenvolvimento e/ou progressão de carcinomas lobulares.

Palavras-Chave: Câncer de mama, perda de heterozigose, instabilidade de microssatélite, 3p.

ABSTRACT

Breast cancer is characterized by a high genetic heterogeneity, which reflects in its clinical and histopathological diversity. In these tumors, allelic losses are frequent and commonly involve regions that contain tumors suppressor genes (TSGs), such as the region of the short arm of chromosome 3. In this study, we analyzed loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MI) in 142 patients with primary breast cancer using seven microsatellite markers in 3p: D3S1307 (3p26.3), D3S1263 (3p25.3), D3S1286 (3p24.3), D3S1581 (3p21.3), D3S1300 (3p14.2, intragenic *FHIT*), D3S1079 (3p14.2) and D3S1274 (3p12.3, intragenic *ROBO1*). LOH and MI were analysed using the Fragment Profiler software (MegaBACE 1000 *Applied Biosystems*) after PCR amplification using the microsatellite markers of DNA samples of frozen tumor tissue and peripheral blood (normal reference) from the patients. Variance and Qui-square tests were applied to correlate the LOH results and the histopathological parameters, which included tumor size and grade, lymph node involvement, hormonal receptor status (ER and PR), and *ERBB2* amplification. LOH was found in all the loci analyzed, with frequencies ranging from 19,7% (D3S1263 marker) to 45,9% (D3S1307 marker). A significant correlation was observed between ER-positivity and loss of the D3S1274 marker ($\chi^2_1=8,119$; $P<0,01$). Also, a high frequency of allelic loss for the D3S1274 marker was observed in lobular carcinomas (75%) when compared to ductal carcinomas (31,8%) and rare histological types (33%) ($\chi^2_2=5,42$; $P<0,05$). Microsatellite instability (MI) was observed for six markers, with frequencies ranging from 1,9% (D3S1581 marker) to 5,4% (D3S1300 marker). Based on our results, we conclude that the loci studied in the 3p region include specific target genes whose inactivation can be involved in mammary carcinogenesis. The high frequency of LOH in the 3p12.3 region found in lobular carcinomas should be further investigated in order to associate the involvement of this region (and possible of the *ROBO1* gene) in the development and/or progression of lobular carcinomas.

Keywords: Breast cancer, loss of heterozygosity, microsatellite instability, 3p.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Regiões de LOH e Genes supressores tumorais (GSTs) candidatos.....	30
TABELA 2. Identificação das pacientes, tipo histológico do tumor, e número de pacientes analisados.....	39
TABELA 3. Informações sobre a localização, tamanho dos fragmentos e frequência de heterozigose descrita no GDB para cada marcador microssatélite.....	42
TABELA 4. Informações sobre a sequência dos iniciadores e o fluorocromo utilizado para cada marcador microssatélite.....	43
TABELA 5. Composição da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	45
TABELA 6. Frequências de LOH e MI obtidas nos sete marcadores microssatélites em 3p.....	50
TABELA 7. Médias dos tamanhos dos tumores e número de pacientes que apresentaram ou não LOH para os sete marcadores microssatélites em 3p.....	51
TABELA 8. Análise da variância para a comparação das médias dos tamanhos dos tumores dos pacientes que apresentaram ou não LOH nos sete marcadores microssatélites em 3p.....	52
TABELA 9. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com carcinoma ductal, lobular e tipos histológicos raros nos sete marcadores e resultados do teste de χ^2	53
TABELA 10. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com receptor de estrogênio positivo ou negativo nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2	53
TABELA 11. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com receptor de progesterona positivo ou negativo nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2	54
TABELA 12. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com graus I, II, e III de diferenciação tumoral nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2	55
TABELA 13. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com e sem presença de metástases em linfonodos regionais nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2	55
TABELA 14. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com presença ou ausência de amplificação do oncogene <i>ERBB2</i> nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Modelo hipotético da progressão do câncer de mama.....	20
FIGURA 2: Subtipos Moleculares do Câncer de Mama.....	23
FIGURA 3. Gráfico representativo dos genes mapeados em 3p.....	44
FIGURA 4: Exemplo de perfil dos alelos do marcador D3S1263.....	47
FIGURA 5: Exemplo de perfil dos alelos do marcador D3S1283.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP1 : BRCA1 Interacting Protein 1

BRCA1: Breast Cancer 1

CGH : Hibridização Genômica Comparativa (*Comparative Genomic Hybridization*)

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DUTT1: Deleted in U Twenty Twenty

ERBB2: Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2

FANCD2: Fanconi Anemia Complementation Group D2

FHIT: Fragile Histidine Triad

HER2: Human Epidermal Growth Factor

GRAU I: Tumor bem diferenciado

GRAU II: Tumor moderadamente diferenciado

GRAU III: Tumor pouco diferenciado

RARB: Retinoid Acid Receptor Beta

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LOH: Perda de Heterozigose (*Loss of Heterozygosity*)

MI: Instabilidade de Microssatélite (*Microsatellite Instability*)

MS: Ministério da Saúde

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAHs: Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

RASSF1: Ras Association Domain Family Protein 1

RBM5: RNA Binding Motif Protein 5

RE: Receptor de Estrogênio

RH: Receptor Hormonal

ROBO1: Roundabout, Drosophila homolog of 1

RP: Receptor de Progesterona

THRB: Thyroid Hormone receptor Beta 1

T3: Triiodotironina

VHL : Von Hippel-Lindau

3p: Braço Curto do Cromossomo Três

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER	15
2.2 CARCINOMA MAMÁRIO	17
2.2.1 Epidemiologia	17
2.2.2 Aspectos Clínico-patológicos e Classificação dos Tumores de Mama	18
2.2.3 Classificação Molecular dos Tumores de Mama	22
2.2.4 Fatores de Risco	24
2.2.5 LOH e sua Associação com o Câncer de Mama	27
2.2.6 Genes Supressores Tumoriais Candidatos	30
3. JUSTIFICATIVAS	36
4. OBJETIVOS	37
5. MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	38
5.2 COLETAS DO SANGUE PERIFÉRICO E DO TECIDO TUMORAL	39
5.3 EXTRAÇÃO DO DNA	40
5.3.1 Tecido Tumoral	40
5.3.2 Sangue Periférico	41
5.4 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA	42
5.5 ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH)	42
5.6 ANÁLISE DE INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE (MI)	48
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
6. RESULTADOS	50
6. 1 ANÁLISES DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS	51
7. DISCUSSÃO	57
8. CONCLUSÕES	69
9. REFERÊNCIAS	70
10. APÊNDICE	87
11. ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a maior causa de morte por câncer na população feminina no mundo (KALEMKERIAN *et al.*, 2006). No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 são de 49.400 novos casos, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2008).

O câncer de mama é uma doença heterogênea que apresenta variações genéticas, moleculares e histopatológicas que podem resultar em diferentes respostas clínicas (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). Dessa forma, o entendimento da biologia do câncer de mama e dos mecanismos que regulam os processos de iniciação e progressão tumoral, e a busca por marcadores moleculares são importantes para o desenvolvimento de melhores procedimentos diagnósticos com repercussões terapêuticas e prognósticas.

As alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento do câncer envolvem principalmente a expressão aumentada de oncogenes e/ou à inativação de genes supressores tumorais (RODENHISER e MANN, 2006), resultando na desregulação da proliferação celular, seleção clonal e formação do tumor.

A perda de heterozigose (LOH) definida como a perda de um alelo em um loco heterozigoto, é uma das alterações mais freqüentemente observadas no câncer de mama (MYAKIS e SPANDIDOS, 2002). Os microssatélites são constituídos por seqüências repetidas de DNA e por serem altamente polimórficos são usados como marcadores no estudo da perda de heterozigose (LOH) através da comparação do DNA extraído de células tumorais e de tecido normal do mesmo indivíduo (MARTINEZ, 2006).

Os microssatélites também podem originar variantes, aumentando ou diminuindo o número de repetições. Este processo é chamado de instabilidade de microssatélites (MI: do inglês "*Microsatellite Instability*") (ABE *et al.*, 2001) e é associado a mutações em genes de reparo e erros de pareamento do DNA. A ocorrência da MI em regiões codificantes de genes ou áreas do genoma envolvidas com a regulação da transcrição pode resultar no desenvolvimento do câncer (RICHARDS e SUTHERLAND, 1992).

Perdas de heterozigose no braço curto do cromossomo 3 (3p) têm sido descritas em muitos cânceres humanos incluindo o câncer de mama. A análise detalhada de locos específicos na região 3p é de grande importância para o entendimento das alterações genéticas que ocorrem nesta região, contribuindo para a identificação de genes supressores tumorais nela situados que possam estar envolvidos com a carcinogênese mamária.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER:

A iniciação do câncer ocorre devido à transformação (genética e epigenética) de uma única célula. A subsequente progressão tumoral é dirigida pelo acúmulo de alterações genéticas em genes reguladores do crescimento e diferenciação celular que resulta na expansão clonal e seleção dessas células (POLYAK, 2007).

Um tumor é considerado um câncer apenas se for maligno, ou seja, somente se suas células tiverem adquirido a capacidade de invadir os tecidos adjacentes, através da desagregação, penetração na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos e formação de tumores secundários, denominados metástases, em outros locais do corpo (ALBERTS, 2004).

A carcinogênese representa um processo em etapas, envolvendo pelo menos quatro a sete alterações genéticas (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993). Isso explica porque o câncer pode se desenvolver anos após a exposição a um carcinógeno e a sua incidência aumenta com a idade, estando associado ao envelhecimento.

As células tronco são definidas como células que possuem a capacidade de auto-renovação e de se multiplicar e diferenciar em diferentes tipos celulares. Devido a essas características as células tronco são potenciais alvos para o acúmulo de mutações que leva ao desenvolvimento do câncer (CLARKE e FULLER, 2006). Dessa forma, tem sido proposta a existência de um grupo de células com características semelhantes a células tronco normais, com capacidade para se diferenciar em células tumorais com grande capacidade de proliferação, resistentes a quimioterapia ou radioterapia, e que frequentemente expressam marcadores de superfície semelhantes às células tronco normais. Estas são chamadas células iniciadoras de tumor (NEUZIL *et al.*, 2007) e seriam as responsáveis pelo crescimento, progressão e recorrência tumoral (CLARKE e FULLER, 2006; POLYAK e HAHN, 2006).

Uma vez que as células iniciadoras de tumor não respondem às terapias convencionais de tratamento do câncer, o entendimento dos marcadores específicos e mecanismos moleculares que tornam essas células resistentes à terapia são importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que atuem especificamente sobre essas células impedindo a recorrência da doença (NEUZIL *et al.*, 2007).

As principais anormalidades genéticas observadas no câncer incluem a expressão aumentada de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, instabilidades cromossômicas, alterações nos genes de reparo do DNA, reativação da telomerase e alterações epigenéticas (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

As alterações epigenéticas representam um mecanismo importante no desenvolvimento de vários tipos de câncer por alterar a expressão de genes críticos, podendo resultar na expressão aumentada de oncogenes e/ou à inativação de genes supressores tumorais (RODENHISER e MANN, 2006). Estas alterações compreendem mudanças na estrutura da cromatina que influenciam a expressão gênica e podem ocorrer por dois mecanismos principais: metilação do DNA e acetilação de histonas.

Os proto-oncogenes são genes altamente conservados na evolução das espécies e seus produtos são reguladores importantes do crescimento e diferenciação celular em todos os organismos eucariotas. Estão localizados em diversos sítios do DNA e seus produtos regulam a cascata de eventos que mantém a progressão ordenada do ciclo celular, divisão e diferenciação celular. Essa cascata de eventos ativa uma cadeia intracelular de sinais bioquímicos que resulta na ativação e repressão alternada de diversos genes (LOURO *et al.*, 2002).

Quando mutado, um proto-oncogene se transforma em um oncogene, ocorrendo a perda do seu controle normal na regulação do crescimento, o que contribui para a proliferação aumentada de certos produtos protéicos, desregulação da divisão celular e o conseqüente fenótipo maligno da célula (SUGIMURA, 1998). Os oncogenes são genes dominantes no nível celular, ou

seja, mutação em uma única cópia do gene é suficiente para causar a superexpressão de seu produto e a multiplicação desordenada da célula.

Os genes supressores de tumor por sua vez, atuam como reguladores negativos da proliferação celular, retardando a progressão do ciclo e assim bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte programada por apoptose. Alterações que inativam estes genes liberam a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), levando à proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (WEINBERG, 1991). Alterações nos genes supressores de tumor determinam a perda de função e são consideradas recessivas no nível celular, uma vez que a função destes genes somente é perdida quando ambos os alelos são inativados (BIÈCHE *et al.*, 1993).

KNUDSON (1971) estudando retinoblastoma propôs a hipótese dos “dois eventos” que se aplica a maioria dos genes supressores tumorais: dois eventos mutacionais são necessários para o desenvolvimento do câncer. No caso dos cânceres hereditários a primeira mutação é transmitida pela linhagem germinativa e a segunda é somática. No caso dos cânceres esporádicos as duas mutações acontecem no tecido somático como eventos independentes.

2.2 CARCINOMA MAMÁRIO

2.2.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA/ MS, 2008).

No Brasil o número de casos novos de câncer de mama esperados para o ano de 2008, é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Para o Estado do Paraná, as estimativas para o ano de 2008 são de 3010 novos casos, sendo 700 apenas na cidade de Curitiba (INCA/ MS, 2008).

A distribuição geográfica do tumor de mama é muito variada, pois fatores como idade, paridade e nível de desenvolvimento do país interferem na

ocorrência. Sugere-se que o ambiente e/ou estilo de vida influenciam na incidência da doença (INCA/MS, 2008). Além disso, sabe-se que regiões mais desenvolvidas apresentam um aumento da taxa de incidência e de mortalidade por câncer de mama por apresentarem melhores procedimentos diagnósticos e melhores informações em atestados de óbitos.

2.2.2 ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA

Estruturalmente a mama é formada por duas porções distintas: o parênquima e o estroma mamário. O estroma é constituído por tecido conjuntivo, colagénio e tecido adiposo, e tem a função de sustentação da mama. O parênquima é constituído pela porção secretora (ácinos ou alvéolos), e é formado por 15 a 20 lobos mamários (BIRNBAUM *et al.*, 2004). Cada lobo mamário é constituído por um número variável de pequenos lóbulos. Estes consistem numa rede de ductos e de pequenos alvéolos, os quais são revestidos internamente por células luminais (secretoras), e externamente por uma camada de células mioepiteliais (BIRNBAUM *et al.*, 2004).

A glândula mamária é o único órgão que sofre um intenso remodelamento e diferenciação em adultos. Mudanças hormonais em cada ciclo menstrual induzem a proliferação do epitélio mamário, enquanto que durante a gravidez ocorre um intenso processo de ramificação dos ductos e aumento do número de alvéolos (NAVARRETE *et al.*, 2005).

Baseado nessas informações é proposta a existência de células tronco epiteliais mamárias responsáveis pela formação de novas estruturas durante o desenvolvimento da mama (CLARKE e FULLER, 2006). Evidências indicam que essas células têm capacidade de dar origem a células luminais (positivas e negativas para receptor de estrogênio) e mioepiteliais (DONTU *et al.*, 2003; ALLRED *et al.*, 2004) e estão localizadas predominantemente nos ductos mamários (VILLADSEN *et al.*, 2007). Essas células tronco bipotentes são possivelmente o sítio de origem da neoplasia, podendo seguir duas vias de

evolução: a luminal-glandular que dá origem aos tumores de subtipo luminal, e a mioepitelial que dá origem aos tumores de subtipo basal (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

Em relação à progressão tumoral dos carcinomas mamários acredita-se que a hiperplasia ductal atípica (HDA), que é uma lesão pré-maligna caracterizada por camadas de células anormais dentro dos ductos ou dos lóbulos, é precursora do carcinoma *ductal in situ* (CDIS), uma lesão não invasiva que contém células anormais. O CDIS dá origem ao carcinoma invasivo, e uma vez que as células adquirem capacidade invasiva, o risco para o desenvolvimento de metástase aumenta significativamente (POLYAK, 2007; VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007) (Figura 1).

Os linfonodos axilares são os primeiros sítios de metástases para o câncer de mama. O envolvimento destes gânglios linfáticos representa um importante fator prognóstico porque revela, além da metástase local, uma probabilidade maior de desenvolvimento de metástases à distância, podendo atingir órgãos como ossos, fígado, pulmão e cérebro (CLARKE e FULLER, 2006).

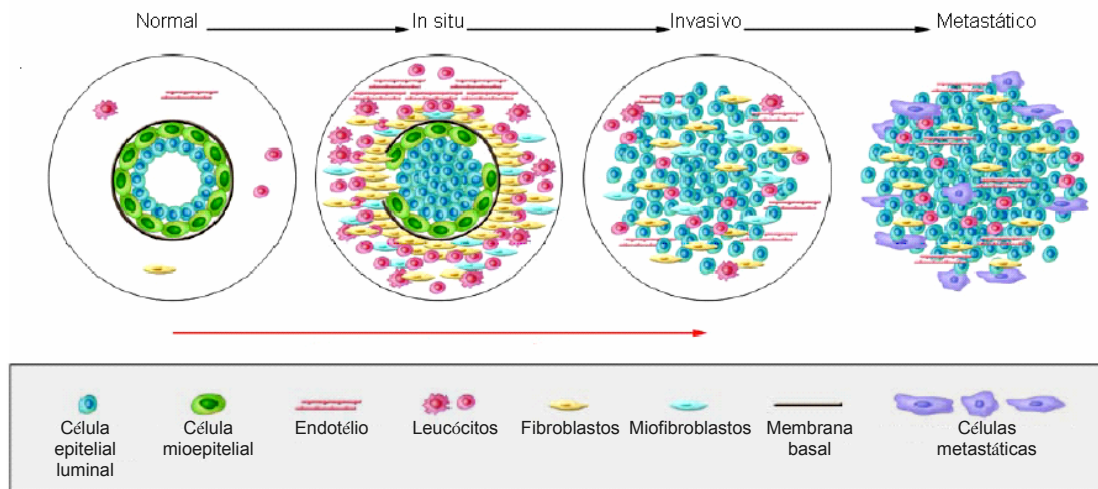


FIGURA 1: Modelo hipotético da progressão do câncer de mama. Esquema da estrutura ducto-mamária normal, carcinoma *in situ*, invasivo e metastático. Os ductos mamários são formados por uma membrana basal composta por uma bicamada de células luminais e mioepiteliais. O estroma mamário é composto por leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. No carcinoma *in situ* o número de células mioepiteliais diminui devido à degradação da membrana basal, enquanto ocorre o aumento das células luminais. Ao mesmo tempo, o número das células que compõem o estroma aumenta. A perda da membrana basal resulta no carcinoma invasivo, e a capacidade das células em invadir tecidos e migrar para órgãos distantes caracteriza o carcinoma metastático. Fonte: POLYAK (2007).

Os tumores de mama são classificados histologicamente de acordo com o sítio de origem da neoplasia, dividindo-se em ductais, que têm seu desenvolvimento nos ductos mamários e representam cerca de 80% dos tumores, e lobulares, desenvolvendo-se no interior dos lóbulos e representando cerca de 10 a 15% dos casos. Outros subtipos raros representam menos de 10% dos casos diagnosticados por ano (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). As pacientes com carcinoma ductal invasivo apresentam um maior envolvimento linfático e um pior prognóstico que aquele verificado nas pacientes com tipos menos frequentes de carcinoma invasivo de mama (KETTERHAGEN *et al.*, 1984).

O estadiamento do tumor e o grau de diferenciação histológico são classificações bastante utilizadas na clínica e são importantes na orientação do tratamento. O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação

dos Tumores Malignos. Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, que considera as características do tumor primário, nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e na presença ou ausência de metástases à distância (INCA/ MS, 2008).

O grau de diferenciação histológico do tumor é uma classificação que correlaciona estruturas morfológicas dos tumores com seu grau de malignidade, e é adotada oficialmente pela Organização Mundial de Saúde (SCARFF e TORLONI, 1968). É baseado na avaliação de três características morfológicas: formação tubular, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica. Estes critérios de graduação são aplicados a todos os tipos tumorais invasivos, exceto o carcinoma medular. Considera-se:

- grau I (baixo) – bem diferenciado e com melhor prognóstico
- grau II (intermediário) – moderadamente diferenciado
- grau III (alto) – pouco diferenciado e com pior prognóstico

O grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor indicando a sua maior ou menor capacidade de metastatização. A associação entre câncer de mama localmente avançado (estadiamento III) e mau prognóstico é um fato amplamente reconhecido (CARTER *et al.*, 1989; HENSON *et al.*, 1991).

O conhecimento dos fatores prognósticos é de fundamental importância na determinação de protocolos terapêuticos com a intensidade e efetividade adequadas e individualizadas para cada paciente.

DHINGRA e HORTOBAGYI (1996) sugerem a organização dos fatores prognósticos em quatro grupos. No primeiro estão os chamados fatores anatômicos (tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos, subtipos histológicos e idade da paciente); no segundo grupo são incluídos aqueles indicando características patológicas quantitativas (grau histológico, necrose tumoral e índice mitótico) e responsividade endócrina (receptores hormonais de estrogênio e progesterona); no terceiro estão os fatores moleculares específicos reguladores do crescimento tumoral (oncogenes e genes supressores tumorais), e no quarto grupo são incluídos os preditores de metástases específicos para os diferentes órgãos. Alguns desses fatores ainda não são aplicados na prática

clínica como marcadores prognósticos definitivos, sendo restritos ainda aos estudos experimentais.

2.2.3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS TUMORES DE MAMA

Baseada em estudos de perfis de expressão gênica é proposta uma classificação molecular dos tumores mamários. Cinco subgrupos tumorais são identificados: subtipo luminal A, luminal B, basal, *HER2+* e o subtipo normal (do inglês: normal breast-like) (PEROU *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2006; SORLIE *et al.*, 2006) (Figura 2).

Essa classificação baseia-se na presença dos receptores hormonais (RH): receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP), e na amplificação do oncogene *ERBB2* que codifica para o receptor tipo 2 do fator de crescimento epitelial humano (sendo por isso chamado *HER2*: Human Epidermal growth factor Receptor-type 2) (MULLAN e MILLIKAN, 2007).

A presença desses marcadores tem sido interpretada como fator prognóstico e preditivo de resposta terapêutica (EISENBERG e KOIFMAN, 2001). A identificação dos receptores hormonais representa um marcador de diferenciação desses tumores. A maioria dos autores demonstra que existe uma associação positiva entre a presença de um RH e prognóstico mais favorável (EISENBERG e KOIFMAN, 2001). Carcinomas com receptores de estrógenos e/ou progesterona positivos apresentam melhor evolução clínica. Em relação ao oncogene *ERBB2*, sua amplificação está associada com pior prognóstico, estando relacionada com elevação do risco para recidivas e metástases (BOECKER e BUERGER, 2003).

De uma maneira geral as pacientes com o subtipo luminal A apresentam melhor prognóstico do que as pacientes com outros subtipos de tumor. O subtipo basal é o que apresenta pior prognóstico, pois cerca de 80 a 90% destes tumores são triplo-negativos os quais não respondem nem a terapias hormonais (por exemplo a droga anti-estrogênica tamoxifen) nem a herceptina (anticorpo

monoclonal que atua especificamente nos receptores *HER2*) (ANDRE, DOMONT e DELALOGUE, 2007; SHIPITSIN *et al.*, 2007).

Alguns subtipos de tumores possuem alterações genéticas específicas (WANG *et al.*, 2004) e diferentes perfis de expressão gênica em resposta a quimioterapia (TROESTER *et al.*, 2004) sugerindo que estes cinco subtipos de carcinoma mamário representam doenças distintas (BERTUCCI *et al.*, 2005). Esses subtipos são conservados entre diferentes grupos étnicos (YU *et al.*, 2004), evidenciando ainda mais a importância dessa classificação para o prognóstico e o desenvolvimento de novas terapias para o câncer de mama.

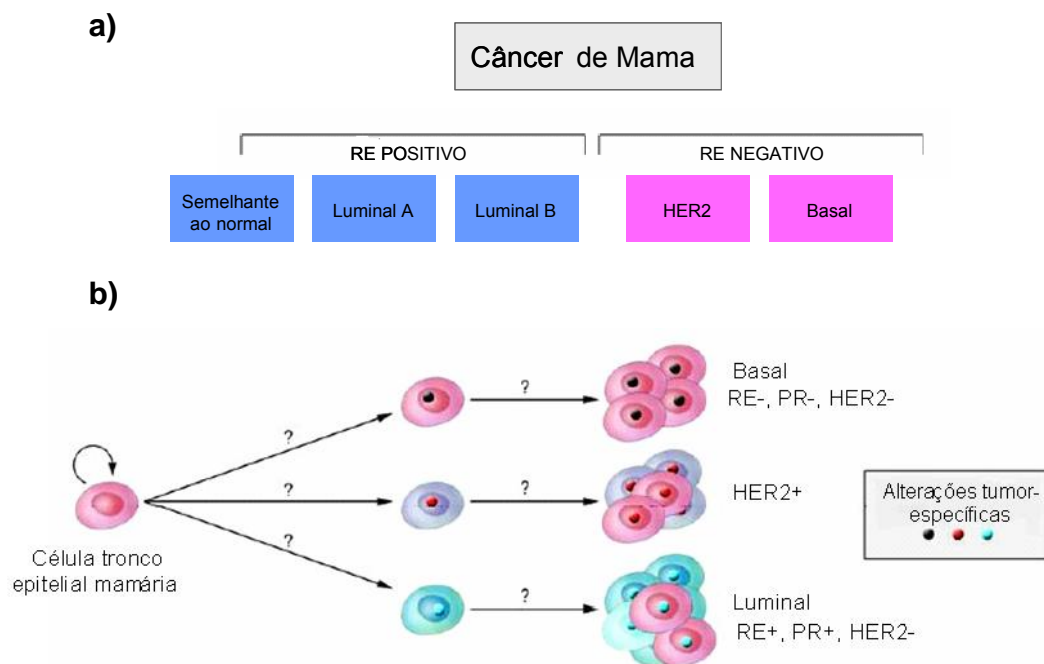


FIGURA 2: Subtipos Moleculares do Câncer de Mama. a) Classificação molecular **b)** Hipótese proposta para a origem dos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama: as células tronco do epitélio mamário bipotentes dão origem à células progenitoras (presumivelmente células tronco) da linhagem mioepitelial (basal) e luminal. Alterações genéticas e epigenéticas podem ocorrer tanto nas células tronco epiteliais bipotentes quanto nas células progenitoras dando origem a tumores com características moleculares específicas. Fonte: modificado de MULLAN e MILLIKAN (2007) e POLYAK (2007).

2.2.4 FATORES DE RISCO

Os principais fatores de risco para o câncer de mama estão relacionados com o histórico hormonal e reprodutivo da mulher, tais como menarca precoce, menopausa tardia e número de filhos (LAMBE *et al.*, 1996; GREENLEE *et al.*, 2000).

Mulheres que têm a primeira gestação antes dos 24 anos apresentam diminuição do risco de desenvolvimento do câncer de mama, e gestações adicionais aumentam essa proteção (LAMBE *et al.*, 1996).

Este efeito foi demonstrado em experimentos com roedores através da administração de carcinógenos que são conhecidos por induzir tumores na glândula mamária de ratas. A administração da droga em ratas nulíparas provoca o desenvolvimento de tumores na mama desses animais, mas o mesmo carcinógeno não induz tumores em ratas que já tiveram uma gestação completa (TAY e RUSSO, 1981).

A alta susceptibilidade de ratas nulíparas em desenvolver tumores é resultado da interação do carcinógeno com as células que estão rapidamente se dividindo e possuem baixa capacidade de sistemas de reparo do DNA nas estruturas indiferenciadas da glândula mamária (RUSSO e RUSSO, 1996).

Estas observações sugerem que os danos no DNA causados pela radiação, carcinógenos ambientais, desequilíbrios hormonais, agindo isoladamente ou em combinação com predisposição genética, induzem o desenvolvimento do câncer de mama pela interação com as estruturas não diferenciadas da glândula mamária (RUSSO, TAY e RUSSO, 1982). Essa combinação multifatorial acontece durante o período de alta susceptibilidade que vai desde a menarca até a primeira gravidez da mulher, mesmo que as células danificadas sejam detectadas clinicamente depois de muitos anos da exposição ao carcinógeno e após vários estádios de transformação maligna (RUSSO *et al.*, 2005).

RUSSO e RUSSO (1996) classificam os lóbulos mamários de acordo com a sua evolução e diferenciação em 4 subtipos:

Lóbulo do tipo I: é o tipo de lóbulo mais indiferenciado, encontrado em nulíparas depois da puberdade. Apresentam alta taxa de proliferação celular e elevada concentração de receptores de estrogênio e progesterona.

Lóbulo do tipo II: com o processo de diferenciação, passam a existir numerosos ductos por lóbulo e tem início a arborização lobular. Deve-se ao estímulo hormonal cíclico dos ovários. Os lóbulos do tipo II se desenvolvem em lóbulos do tipo III.

Lóbulo do tipo III: no segundo trimestre da gravidez ocorre o aumento dos ductos e a vascularização do tecido mamário.

Lóbulo do tipo IV: observado no final da gestação e durante a lactação, é caracterizado pela grande distensão lobular. Depois da lactação o lóbulo do tipo IV regride para lóbulo III, e permanece nessa estrutura até a quarta década de vida da mulher, quando sofre involução para lóbulo II e I.

Em contraste à mama de mulheres que já tiveram filhos, a estrutura mamária de mulheres nulíparas contém grande quantidade de lóbulos tipo I, cuja porcentagem se mantém constante ao longo da vida. Os lóbulos tipo II estão presentes em pequenas quantidades e os lóbulos do tipo III são praticamente ausentes.

RUSO e RUSSO (1996) encontraram similaridades entre a arquitetura da mama de mulheres nulíparas e mulheres que tiveram câncer de mama, indicando que os lóbulos tipo I encontrados nessas mulheres nunca passaram pelo processo de diferenciação, retendo uma grande quantidade de células epiteliais indiferenciadas, as células tronco, susceptíveis a transformação neoplásica.

Estudos demonstram que o efeito protetor da gravidez para o câncer de mama aumenta a cada gestação (ALBREKTSEN *et al.*, 2005) e que o tempo prolongado de amamentação também é um importante fator protetor para o câncer de mama (ALTHUIS *et al.*, 2004; PEREZ-ESCAMILLA e GUERRERO, 2004).

O risco para o desenvolvimento do câncer de mama também é maior em mulheres que apresentam menarca precoce (antes dos 11 anos de idade) e menopausa tardia (após os 50 anos de idade, em média) (PARKIN *et al.*, 2001).

Tem-se estimado que a cada ano em que a menarca ocorra mais tardiamente, o risco de câncer de mama diminui cerca de 10 a 20% (HENDERSON *et al.*, 1991, HARRIS *et al.*, 1992). Este efeito é consequência do maior tempo de exposição ao estrogênio endógeno ao longo da vida dessas mulheres.

Além de ser um ativador da proliferação das células do tecido mamário, acredita-se que o estrogênio possua um efeito anti- apoptótico, impedindo a morte programada das células que sofreram danos no DNA e conseqüentemente em genes importantes que controlam o ciclo celular (NAROD e FOULKES, 2004).

Em relação ao uso de contraceptivos orais e o risco de câncer de mama, muitos estudos demonstram que certos subgrupos de mulheres, particularmente as que usam pílulas anticoncepcionais com dosagens elevadas de estrogênios e/ou por longo período de tempo, têm maior risco (PARKIN *et al.*, 2001). KAHLENBORN *et al.* (2006) realizaram uma meta-análise com 34 trabalhos de 17 países, entre eles o Brasil, que relacionam o uso dos contraceptivos orais e o risco do câncer de mama. Os resultados dessa meta-análise sugerem que o uso dos contraceptivos orais está associado com o aumento do risco do câncer de mama entre mulheres pré-menopausa ou com idade superior a 50 anos. O risco parece ser maior para mulheres que fazem uso da pílula antes da primeira gravidez. Estudos também demonstram que o risco diminui logo após o término do uso atingindo os parâmetros normais de risco em dez anos. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde classificou os contraceptivos orais e as terapias de reposição hormonal como carcinógenos do grupo 1, ou seja, agentes causadores de câncer em seres humanos (IARC, 2007).

Entre os fatores de risco ambientais, a exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) tem sido sugerida para a contribuição no desenvolvimento do câncer de mama (VAURY *et al.*, 1995). Embora o tabagismo, uma das principais fontes de exposição aos PAHs, não pareça estar associado com o risco de desenvolvimento de carcinomas mamários (COLDITZ, 1993), alguns estudos experimentais sugerem o envolvimento dos PAHs como carcinógenos para câncer de mama (PERERA *et al.*, 1995). TERRY *et al.* (2002) encontraram associação positiva, porém fraca, em indivíduos que apresentavam

longa duração do hábito tabagista. Estudos epidemiológicos vêm sugerindo associações positivas em certos subgrupos de mulheres, por exemplo, as muito jovens que durante a gravidez apresentam o hábito tabagista (INNES e BYERS, 2001), assim como mulheres que possuem receptores de hormônios negativos (MANJER *et al.*, 2001).

Outros fatores que, embora controversos, parecem aumentar o risco de câncer de mama são a ingestão de dieta gordurosa e o consumo elevado de álcool (PARKIN *et al.*, 2001). Alguns trabalhos sugerem que o consumo de vitamina A, frutas e vegetais podem reduzir o risco de desenvolver a doença e que a obesidade está relacionada com o maior risco em mulheres pós-menopausa (GUIMARÃES, 2004).

2.2.5 LOH E SUA ASSOCIAÇÃO COM O CÂNCER DE MAMA

Os microssatélites são seqüências de DNA na qual um a seis nucleotídeos são repetidos numerosas vezes em “tandem”. Por serem altamente polimórficos os microssatélites são usados como marcadores no estudo da perda de heterozigose e instabilidades de microssatélites através da comparação do DNA extraído de células tumorais e de tecido normal do mesmo indivíduo (MARTINEZ, 2006).

A perda de heterozigose (LOH) é definida como a perda de um alelo em um loco heterozigoto e pode representar um dos dois eventos mutacionais que causam a inativação de um gene supressor de tumor. O outro evento pode acontecer através de mutação pontual ou silenciamento epigenético. Em cânceres familiares a inativação de um gene supressor tumoral geralmente ocorre pela mutação gênica seguida da LOH, como consequência da predisposição à alteração genética. Nos cânceres esporádicos ainda não se sabe qual dos eventos acontece primeiro durante a tumorigênese (THIAGALINGAM *et al.*, 2002).

A LOH pode ocorrer de diversas maneiras (THIAGALINGAM *et al.*, 2002):

- pela perda de material genético, envolvendo um cromossomo inteiro ou um segmento do braço cromossômico;

- por recombinação mitótica entre homólogos
- por translocação

Os microssatélites também podem originar variantes, aumentando ou diminuindo o número de repetições. Este processo é chamado de instabilidade de microssatélites (MI: do inglês “*Microsatellite Instability*”) (ABE *et al.*, 2001) e é associado a mutações em genes de reparo e erros de pareamento do DNA.

Vários sítios de perdas alélicas são descritos em carcinomas mamários. Em uma meta-análise realizada com 151 trabalhos de LOH (totalizando mais de 15.000 tumores mamários) observou-se que as perdas ocorrem preferencialmente nos cromossomos 7q, 16q, 13q, 17p, 8p, 21q, 3p, 18q, 2q e 19p (em ordem decrescente de frequência) (MILLER *et al.*, 2003).

VAN DE VIJVER e NUSSE (1991) comparando DNA de carcinomas mamários com o DNA de células normais da mesma paciente através do uso de *RFLP* (Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição, do inglês “*Restriction Fragment Length Polymorphisms*”) detectaram a perda de heterozigose para vários locos, podendo ocorrer ocasionalmente no mesmo tumor.

MOINFAR *et al.* (2000) em estudo com carcinomas mamários, encontrou perda de heterozigose em 17 dos 22 tumores analisados (77%). As regiões cromossômicas mais comumente afetadas foram: 11q21-23.2, 16q23.1-24-2, e 3p14.2 com frequência igual a 50%, 45% e 41%, respectivamente.

A perda de heterozigose envolvendo marcadores polimórficos no braço curto do cromossomo 3 (3p) é uma alteração observada em muitos tipos de cânceres esporádicos, como o de pulmão, cabeça e pescoço, tireóide, útero, ovário, esôfago, mama, renal, gástrico e em neuroblastomas (revisado em YAMAMOTO *et al.*, 2007).

Diversos estudos demonstram altas frequências de perda em 3p em carcinomas mamários. MAITRA *et al.* (2001) utilizaram 27 marcadores microssatélites em 3p e encontraram LOH em pelo menos uma das regiões analisadas em 39 (87%) das 45 amostras de tumores de mama primários. A região com maior frequência de perda foi 3p21.3 (69%) seguida das regiões 3p22-

24 (61%), 3p21.2-21.3 (58%), 3p25 (48%), 3p14.2 (45%), 3p14.3 (41%) e 3p12 (35%).

Altas freqüências de perda também foram encontradas por TANG *et al.* (2006), que observaram LOH em 3p em 97% das 41 amostras de tumores de mama. Esses autores utilizaram 11 marcadores microssatélites e encontraram as maiores freqüências de perda nas regiões 3p14.2 (53,1%), 3p25 (52,5%) e 3p21-p22 (43,6%). Segundo FU *et al.* (2007) a região mais comum de perda em 3p está entre 3p14 e 3p25 indicando a existência de genes envolvidos com o desenvolvimento tumoral mamário dentro desta região.

Alguns autores relacionam a perda de genes em 3p a uma maior agressividade da doença. ROYLANCE *et al.* (1999), utilizando CGH (Hibridização Genômica Comparativa, do inglês: "Comparative Genomic Hybridization"), descreveram uma maior freqüência de deleções em 3p em tumores de grau III, comparados aos tumores de grau I. MARTINEZ *et al.* (2001) encontraram uma associação significativa entre a LOH em 3p e a perda da expressão de receptores de estrogênio e progesterona, sugerindo que os genes localizados no braço curto do cromossomo 3 estão envolvidos no controle da diferenciação e progressão da doença, estando associados à maior gravidade do estado clínico das pacientes.

CHEN *et al.* (1992) analisando a perda de heterozigose em 98 tumores primários encontraram os mesmos valores de perdas alélicas para linfonodos metastáticos e tumores primários, sugerindo que estas perdas ocorrem em uma fase inicial da progressão maligna. Esta sugestão é reforçada por descrições de deleções em 3p em tumores benignos de mama embora com freqüências menores que as encontradas em carcinomas mamários (MAITRA *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2006) indicando que a perda de regiões no braço curto do cromossomo 3 é um evento importante na origem e desenvolvimento dos carcinomas mamários.

2.2.6 GENES SUPRESSORES TUMORAIS CANDIDATOS

Inúmeros trabalhos propõem a existência de genes supressores tumorais localizados no braço curto do cromossomo 3 (3p). A Tabela 1 apresenta os principais candidatos a supressores em 3p que podem estar envolvidos com a carcinogênese mamária.

Tabela 1. Regiões de LOH e Genes supressores tumorais (GSTs) candidatos

Regiões de LOH	GSTs candidatos
3p26-p25	<i>VHL</i>
3p25.3	<i>FANCD2</i>
3p24.3	<i>THRB</i>
3p24	<i>RARB</i>
3p21.3	<i>RBM5, BAP1</i>
3p21	<i>RASSF1</i>
3p14.2	<i>FHIT</i>
3p12	<i>ROBO1</i>

FONTE: JENSEN *et al.*, (1998); SUNDARESAN *et al.*, (1998a); MARTINEZ *et al.*, (2001) YANG *et al.*, (2002); ZABAROVSKY *et al.* (2002); BARROSO *et al.*, (2006); VAN DER GROEP *et al.*, (2008).

VHL: VON HIPPEL LINDAU

A síndrome de Von Hippel Lindau é uma síndrome familiar rara, autossômica dominante, e caracterizada pelo desenvolvimento de vários tipos de tumores benignos e malignos, principalmente hemangioblastomas e carcinoma renal (LEUNG *et al.*, 2008). A doença é causada pela inativação do gene *VHL* localizado na região 3p25-p26 e que também encontra-se inativado em cerca de 70% dos pacientes com carcinoma de células renais esporádicos (LATIF *et al.*, 1993; FOSTER *et al.*, 1994; CLIFFORD *et al.*, 1998). A perda de função deste gene também tem sido associada a tumores benignos da retina, cérebro, pâncreas e de mama, indicando a sua função como gene supressor tumoral (revisado em ZABAROVSKY *et al.*, 2002).

KIM *et al.* (1998) demonstraram que o gene *VHL* atua no controle da proliferação celular através da regulação da proteína p27Kip1 atuando tanto no controle transcricional como pós-transcricional, sendo importante em diversos tipos de tumores.

ZIA *et al.* (2006) demonstraram que a presença do gene *VHL* inibe a capacidade de invasão e migração das células de câncer de mama *in vitro*, e que baixas concentrações da proteína codificada por este gene são encontradas em tumores de mama agressivos, sugerindo o gene *VHL* como candidato a supressor tumoral com função na carcinogênese mamária.

FANCD2: FANCONI ANEMIA COMPLEMENTATION GROUP D2

Estudos mostram que o gene *FANCD2*, mapeado na região 3p25.3 (HEJNA *et al.*, 2000) e conhecido por seu envolvimento na anemia de Fanconi, também está relacionado com o câncer de mama esporádico (BARROSO *et al.*, 2006; VAN DER GROEP *et al.*, 2008).

Este gene, que é expresso em células proliferativas na glândula mamária normal (HOLZEL *et al.*, 2003), codifica para uma proteína que interage com o gene *BRCA1* atuando no processo de reparo do DNA (BARROSO *et al.*, 2006). Segundo GARCIA-HIGUERA *et al.* (2001) a função do *FANCD2* é importante para garantir a integridade do genoma durante a replicação celular. Além disso, HOUGHTALING *et al.*, (2003) demonstraram que camundongos com perda da função desse gene desenvolveram tumores de mama, sugerindo que a inativação do *FANCD2* é um mecanismo importante para a carcinogênese mamária.

RARB: RETINOIC ACID RECEPTOR BETA 2

O ácido retinóico (AR) é um metabólito ativo da vitamina A e β -caroteno que tem importante papel no controle da proliferação e diferenciação celular e na regulação da apoptose (SPORN *et al.*, 1994; ALTUCCI e GRONEMEYER, 2001).

A ação do AR é obtida através da ligação com receptores específicos, que fazem parte da superfamília de receptores nucleares. Existem dois tipos: o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor de retinóide X (RXR). Cada família

apresenta os subtipos α , β e γ . RAR e RXR atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes modulando a expressão dos genes responsivos ao AR (PFAHL, 1994; CHAMBON, 1996).

O gene para o receptor do ácido retinóico $\beta 2$ está mapeado em 3p24 (CHAMBON, 1996), uma região que exhibe freqüentes perdas em tumores mamários (MATSUMOTO et al., 2000; YANG et al., 2001a).

Experimentos com transdução retroviral de linhagens celulares com o gene *RARB* resultaram na inibição da proliferação tumoral. Baixos níveis ou a ausência da proteína RARB foram encontrados em tumores malignos, incluindo câncer de pulmão, carcinoma de cabeça e pescoço e câncer de mama (XU et al., 1997; PICARD et al., 1999). Estes achados sugerem que o gene RARB desempenha um importante papel na limitação do crescimento de muitos tipos celulares, e que a perda desta atividade regulatória está associada com a tumorigênese (YANG et al., 2002).

THRB: THYROID HORMONE RECEPTOR BETA1

O hormônio tireoidiano T3 (triiodotironina), um ativador do metabolismo celular, atua nas células do organismo através da ligação com seus receptores (TRs). A glândula mamária normal expressa quantidades significativas desses receptores (SELLITI et al. 1983). Dois genes, o *THRA* e o *THRB*, localizados nos cromossomos 17 e 3 respectivamente, codificam para esses receptores. Estes, por sua vez, atuam como fatores transcripcionais receptor-ligante regulando a transcrição de genes alvos na presença do seu ligante, o hormônio T3. Estudos têm mostrado que a expressão dos genes *THRA* e *THRB* encontra-se alterada em tumores de mama sugerindo o seu envolvimento com a carcinogênese mamária (SILVA et al., 2002).

O gene *THRB* está localizado em 3p24.3 (ALBERTSON; SHERRINGTON e RABBITS, 1989), região com alta freqüência de LOH em cânceres de mama. Estudos mostram que o produto codificado pelo gene pode atuar como um ativador transcricional na presença do hormônio e como silenciador na ausência

do mesmo (DAMM *et al.*, 1998). Dessa forma, o gene *THRB* pode ser candidato a oncogene e ao mesmo tempo, a gene supressor tumoral para o câncer de mama.

RASSF1: RAS ASSOCIATION DOMAIN FAMILY PROTEIN 1

Diversos estudos indicam que o gene *RASSF1* mapeado na região 3p21 está relacionado com a supressão tumoral em cânceres de mama (MARTINEZ *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2002; ZABAROVSKY *et al.*, 2002). Este gene, que codifica duas isoformas protéicas (*RASSF1A* e *RASSF1C*), atua como regulador negativo da proliferação celular através da inibição da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (SHIVAKUMAR *et al.*, 2002).

A hipermetilação do gene *RASSF1* foi detectada em muitas linhagens celulares de câncer de mama e em 49% a 62% das amostras de tumores malignos primários (BURBEE *et al.*, 2001; DAMMANN *et al.*, 2001). BURBEE *et al.* (2001) demonstraram que a frequência de metilação do gene *RASSF1* é semelhante à frequência de LOH encontrada em 3p21, região que contém o gene. Dessa forma, a metilação e a LOH parecem ser os principais mecanismos de perda da função de *RASSF1*, uma vez que mutações pontuais parecem ser raras neste gene (DAMMANN *et al.*, 2000).

RBM5: RNA BINDING MOTIF PROTEIN 5

Evidências recentes sugerem que o gene *RBM5* (também conhecido como *LUCA15* ou *H37*), e mapeado na região 3p21.3 (TIMMER *et al.*, 1999), atue como regulador da apoptose e esteja envolvido com o controle da proliferação tumoral em cânceres humanos (LERMAN e MINNA, 2000; OH *et al.*, 2002; RINTALAMAKI e SUTHERLAND, 2004).

A baixa expressão desse gene foi encontrada em amostras de câncer de mama (EDAMATSU *et al.*, 2000) e em 75% das amostras de câncer de pulmão (OH *et al.*, 2002). EDAMATSU *et al.* (2000) demonstraram que a superexpressão de *RBM5* suprime o crescimento de células de fibrosarcoma humano.

Os resultados que relacionam o gene *RBM5* com o controle da proliferação tumoral e as altas frequências de LOH encontradas na região 3p21, sugerem este gene como mais um candidato a supressor de tumor localizado nesta região.

BAP1: BRCA1 ASSOCIATED PROTEIN 1

JENSEN *et al.* (1998) descreveram uma proteína, a BAP1 (do inglês: *BRCA1 – interacting protein 1*) que se liga ao gene *BRCA1* em seu domínio *ring-finger* e atua nos processos regulatórios dependentes de ubiquitinação, incluindo transcrição, remodelamento da cromatina, controle do ciclo celular e reparo do DNA (JENSEN *et al.*, 1998). Os mesmos autores mapearam o gene que codifica para a proteína, que foi chamado de *BAP1*, em 3p21.3 sugerindo o mesmo como gene supressor tumoral envolvido no câncer de mama (JENSEN *et al.*, 1998).

Foi observado que a expressão do gene *BAP1* ocorre nos mesmos tecidos em que ocorre a expressão do gene *BRCA1*, e a expressão temporal dos dois genes também coincide na glândula mamária de camundongos (JENSEN *et al.*, 1998).

FHIT: FRAGILE HISTIDINE TRIAD

O gene *FHIT* foi mapeado por OHTA *et al.* (1996) na região 3p14.2 e recebeu esse nome por conter o sítio frágil mais conhecido do genoma humano, o FRA3B (OHTA *et al.*, 1996). Os sítios frágeis são regiões cromossômicas que apresentam zonas de quebra, dando origem às instabilidades cromossômicas. Eles representam locais de difícil reparo do DNA após exposição a agentes mutagênicos ambientais.

A presença do sítio frágil FRA3B dentro do *FHIT* sugere que este gene pode apresentar susceptibilidade a rearranjos induzidos por uma variedade de carcinógenos ambientais (YANG *et al.*, 2002).

As análises de LOH demonstram perda alélica na região 3p14 em cerca de 25% dos carcinomas mamários primários (AHMADIAN *et al.*, 1997; INGVARSSON, 2001). Deleções no gene *FHIT* também foram observadas em lesões pré-neoplásicas, sugerindo que alterações nesse gene estão relacionadas

ao desenvolvimento do câncer de mama em estágio inicial (MAN *et al.*, 1996; HUEBNER *et al.*, 1998; SOZZI *et al.*, 1998).

ROBO1: ROUNDABOUT, AXON GUIDANCE RECEPTOR, HOMOLOG 1

O gene *ROBO1* localizado na região 3p12 foi identificado e mapeado por SUNDARESAN *et al.* (1998b) sendo também conhecido por *DUTT1* (KIDD *et al.*, 1998).

Pesquisadores acreditam que a função do gene *ROBO1* está relacionada com os mecanismos de interação célula-célula e a inativação ou diminuição da expressão desse gene poderia resultar na perda da organização tecidual que acontece nos estádios iniciais do desenvolvimento do câncer (CHUNG *et al.*, 1995; HUNG *et al.*, 1995).

O gene *ROBO1* é principalmente relacionado à progressão do câncer de pulmão (SUNDARESAN *et al.*, 1998a), porém devido às altas frequências de LOH encontradas nessa região em tumores de mama, muitos autores consideram o gene *ROBO1* como um supressor tumoral possivelmente envolvido com a carcinogênese mamária (SUNDARESAN *et al.*, 1998a; MARTINEZ *et al.*, 2001).

3. JUSTIFICATIVAS

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, as taxas de mortalidade no Brasil são elevadas provavelmente porque a doença é diagnosticada em estádios avançados.

O carcinoma mamário é uma doença heterogênea com grande diversidade histopatológica que pode resultar em diferentes respostas clínicas. O melhor entendimento dos mecanismos que regulam a progressão tumoral e as variações genéticas e moleculares existentes entre os tumores de mama se constitui em importante fator para a identificação de novos marcadores moleculares que auxiliem num diagnóstico mais preciso, contribuindo para a seleção de grupos de pacientes com prognóstico favorável, daqueles que necessitam de uma terapia adjuvante mais intensa.

Sendo a região 3p uma das mais freqüentemente envolvidas nas alterações citogenéticas em cânceres de mama, utilizou-se neste estudo a abordagem por LOH para inferir sobre a presença de genes supressores tumorais com envolvimento na carcinogênese mamária localizados nessa região.

4. OBJETIVOS

- Analisar a região do braço curto do cromossomo 3 (3p) em relação a perdas alélicas, através da avaliação da frequência da perda de heterozigose para sete marcadores microssatélites, relacionando estas alterações a sítios gênicos (supressores de tumor e genes de reparo).
- Analisar a presença de perda de heterozigose com parâmetros clínicos como tipo histológico do tumor, tamanho e grau de diferenciação tumoral, presença de metástases em linfonodos regionais, presença de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e amplificação do oncogene *ERBB2*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Este estudo foi realizado com amostras de tumor primário não tratado, e sangue periférico de 142 pacientes, com média de idade de $57,7 \pm 13,7$ anos, provenientes do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas de Curitiba, Paraná.

Através de entrevista pessoal com as pacientes foram apresentadas as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I), para posterior coleta do material. As mulheres participantes também forneceram as informações apresentadas no questionário pessoal contendo histórico pessoal, de saúde, hormonal e reprodutivo (Anexo II).

A respeito do histórico hormonal das pacientes, a média de idade da menarca foi $13,15 \pm 1,72$ anos ($n=97$), e a média da idade da menopausa foi $49,1 \pm 4,6$ anos ($n=80$). A diferença entre a idade da menarca e da menopausa, que representa o tempo de exposição ao estrogênio endógeno, obtido em 74 pacientes apresentou uma média de $35,7 \pm 4,9$ anos.

Das 105 pacientes das quais se obteve informação sobre o histórico reprodutivo, 19 pacientes eram nulíparas (18,1%) e 86 (81,9%) tiveram filhos, com uma média de idade da primeira gestação de $23,8 \pm 4,6$ anos.

As informações a respeito do hábito tabagista foram obtidas somente em 46 pacientes, destas, a maioria (76%) eram não fumantes.

Em relação à classificação histopatológica dos tumores, 115 pacientes (83,3%) apresentavam carcinoma ductal invasor, 13 (9,4%) possuíam carcinoma lobular e 10 pacientes (7,3%) apresentavam tipos histológicos raros (Tabela 2). Para quatro pacientes não foi possível obter essa informação.

Tabela 2. Identificação das pacientes, tipo histológico do tumor, e número de pacientes analisados

Paciente	Tipo Histológico dos tumores de mama	(n)
1 - 115	Carcinoma Ductal Invasor	115
116 - 128	Carcinoma Lobular Invasor	13
129	Carcinoma Ducto Lobular Infiltrante	1
130 e 131	Carcinoma Tubulo Lobular Infiltrante	2
132 e 133	Carcinoma Tubular Invasor	2
134 e 135	Carcinoma Medular Invasor	2
136	Tumor Filóide	1
137	Carcinoma Papilífero Invasor	1
138	Carcinoma Apócrino	1
139 - 142	Sem informação	4
Total		142

Dentre as pacientes em que foi possível obter a informação sobre o grau de diferenciação tumoral (n=132), 25 (18,9%) apresentaram tumor de grau I, 68 (51,5%) de grau II e 39 (29,5%) de grau III.

A pesquisa de metástases em linfonodos regionais foi informada em 125 pacientes. Destas, 60 (48%) apresentaram metástases, e 65 (52%) não apresentaram.

A média do tamanho do tumor obtida em 119 das 142 pacientes foi de $3,5 \pm 1,7$ cm.

Os resultados do teste para o receptor de estrogênio (RE) foram obtidos em 78 pacientes, destas 62 (79,5%) eram positivas e 16 (20,5%) negativas. Em relação ao receptor de progesterona, foram obtidas informações de 70 pacientes, sendo 51 (72,9%) positivas e 19 (27,1%) negativas para o receptor.

Das 74 pacientes na qual foi possível obter o resultado do teste para a amplificação do oncogene *ERBB2*, 24 (32,4%) pacientes eram positivas e 50 (67,6%) eram negativas para a amplificação do gene.

5.2 COLETAS DO SANGUE PERIFÉRICO E DO TECIDO TUMORAL

As coletas de sangue foram realizadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. De cada indivíduo foram coletados cerca

de 10 ml de sangue periférico, o qual foi imediatamente colocado em tubos estéreis contendo 1,75 ml de solução anti-coagulante - ACD (0,016 M de ácido cítrico; 0,068 M de citrato de sódio; 0,081 M de glicose, previamente autoclavados), rotulados e enviados para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR e mantidos a 4°C até o processamento.

As amostras do tecido tumoral, após a remoção cirúrgica foram acondicionadas em frascos estéreis e estocadas em condições ideais de temperatura e conservação (-80°C) para posterior extração do DNA. A classificação histopatológica foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela Classificação Internacional de Tumores (WHO, 1990), e o estadiamento clínico foi determinado de acordo com o Estadiamento TNM do Câncer.

5.3 EXTRAÇÃO DO DNA

5.3.1 TECIDO TUMORAL

O tecido tumoral foi descongelado e posteriormente fragmentado com o auxílio de tesouras, pinças e bisturis estéreis. Para a obtenção de DNA de alto peso molecular, seguiu-se o protocolo de extração manual pelo método de Fenol-Clorofórmio.

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga os fragmentos do tecido tumoral, 80µL de tampão da proteinase K 5X, 40µL de proteinase K (10mg/mL), 20µL de SDS 20% e 240µL de água ultrapura e esse conjunto foi homogeneizado em agitador tipo Vortex. Em seguida, o tubo foi incubado no bloco de aquecimento a 60°C por 30 minutos, deixando-se atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir com a metodologia. Foram adicionados na sequência 500 µL de fenol saturado pH 8,0 e 400 µL de clorofórmio, homogeneizando manualmente várias vezes. Após isso, o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Na

seqüência foram adicionados a ele 50µL de acetato de sódio 3M e 1 mL de etanol absoluto para a precipitação do DNA. Caso precipitasse pouco DNA, a amostra era incubada a -20°C por uma hora. Esse novo tubo era centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 500µL de etanol 70% e o tubo foi invertido gentilmente várias vezes, para lavar o DNA, antes de uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo colocado em bloco de aquecimento a 55°C por 10 minutos para que o DNA secasse. Após esse tempo, a amostra de DNA foi ressuspensa em 30 a 50µL de água ultrapura e retornou ao bloco de aquecimento a 95°C por 10 minutos para que a solução de DNA ficasse homogênea. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra de DNA foi armazenada a -20°C.

5.3.2 SANGUE PERIFÉRICO

O DNA das amostras de sangue periférico foi extraído pelo método *salting out* segundo BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA (1997), com modificações. Cerca de 10 mL de sangue periférico foram centrifugados com tampão de lise para células vermelhas RCLB 1X (obtido da solução estoque 10X concentrada: 12,1 g de Tris; 110,2g de MgCl₂; 5,8 g de NaCl e água destilada) a 13000 rpm por 2 minutos. Este processo foi repetido até a obtenção de um botão de glóbulos brancos que foi incubado a 60°C por 40 minutos, juntamente com 80 µl de tampão proteinase K 5X, 40 µl de uma solução de proteinase K (10 mg/mL), 20 µl de SDS 20% e 240 µl de água ultrapura. Em seguida, foi adicionado NaCl para a precipitação protéica, aproveitando-se somente o sobrenadante, onde está o DNA. Após nova centrifugação, foi realizada a precipitação do DNA com a adição de etanol. Ao final do processo, a amostra de DNA foi ressuspensa em 50 µl de água ultrapura e armazenada a -20°C.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro *Gene Quant pro* (*RNA/DNA calculator*). A leitura para quantificação e pureza é procedida em comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros (nm). Para uma amostra de DNA ser considerada pura, a razão da densidade óptica OD_{260}/OD_{280} deverá estar entre 1,6 e 1,8.

Após a quantificação as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 20 ng/ μ l.

5.5 ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH)

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizada para a amplificação dos sete marcadores microssatélites em 3p através da utilização de iniciadores específicos marcados com agentes fluorescentes cujas seqüências foram obtidas no Genome Database - GDB (<http://www.gdb.org>) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Localização, tamanho dos fragmentos e freqüência de heterozigose descrita no GDB para cada marcador microssatélite.

Marcador	Região	Tamanho	Heterozigose (%)
D3S1307	3p26.3	237-251 pb	81,4
D3S1263	3p25.3	244pb	87
D3S1286	3p24.3	119 -153 pb	89,1
D3S1581	3p21.31	78-102 pb	88
D3S1300	3p14.2	217-241 pb	83, 3
D3S1079	3p14.2	133-136 pb	37
D3S1274	3p12.3	128 -136 pb	61,2

Tabela 4. Sequência dos iniciadores e o fluorocromo utilizado para cada marcador microssatélite.

Marcador	Iniciadores	Fluorocromo
D3S1307-1	3'-TAAATGACACTCCAGCAGCA-5'	HEX
D3S1307-2	5'-GCACTCATCAATGTATGGGG-3'	
D3S1263-1	5'-CTGTTGACCCATTGATACCC-3'	HEX
D3S1263-2	3'-TAAAATCACAGCAGGGGTTC-5'	
D3S1286-1	5'-GCAGTGACTTCAGAGGGGC-3'	HEX
D3S1286-2	3'-ATTGACGGGGCTAGGGC-5'	
D3S1581-1	5'-CAGAACTGCCAAACCA-3'	6-FAM
D3S1581-2	3'-GGGTAACAGGAGCGAG-5'	
D3S1300-1	5'-AGCTCACATTCTAGTCAGCCT-3'	6-FAM
D3S1300-2	3'-GCCAATTCCCAGATG-5'	
D3S1079-1	5'-ATCTACCATTAAGGCAACCTG-3'	6-FAM
D3S1079-2	3'-GGGAGATAGGTAGTATCATCT-5'	
D3S1274- 1	5'-TTATACATCAGTCTCTGGGAAACAC-3'	6-FAM
D3S1274- 2	3'-TACTGTGCATATAGGTTCTGTGA-5'	

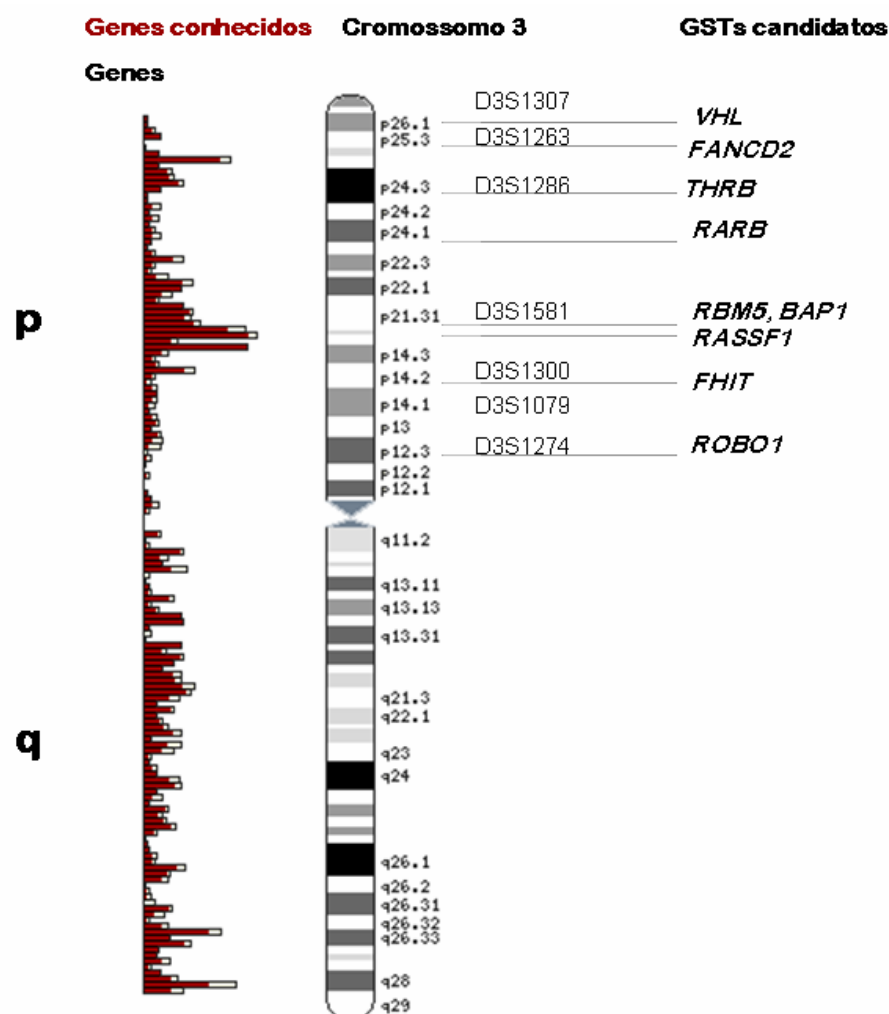


FIGURA 3. Gráfico representativo dos genes mapeados em 3p: (o colorido em vermelho indica a região onde genes conhecidos estão mapeados), localização dos marcadores de microssatélites utilizados no presente trabalho e posição dos genes supressores tumorais (GSTs) candidatos para a região.

Todos os produtos de amplificação foram obtidos utilizando as mesmas condições, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Composição da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Reagentes	Concentração	Concentração na reação
DNA	Variável	20 ng/μL
Tampão	10X	1X
MgCl ₂	25Mm	2,5mM
DNTP	2Mm	200μM
Iniciador 3'	8Mm	480nM
Iniciador 5'	8μM	480nM
Taq DNA polimerase	5U/μL	0,5U
H ₂ O ultra-pura		

As amplificações foram realizadas em ciclos como se segue: 96 C° por 5 min; 30 ciclos de 96 C° por 1 min, 55 C° por 1 min e 72 C° por 1 min; 72 C° por 10 min, usando-se um termociclador *Eppendorf Gradient*.

Os produtos de PCR foram primeiramente analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo para avaliar a presença e especificidade do produto amplificado para cada marcador, bem como o grau de intensidade da banda.

Para a montagem da placa de injeção foi preparada uma solução contendo 999 μL de água ultrapura e 1 μL de TWEEN 20, com uma pequena centrifugação antes de prosseguir. Desta solução foram selecionados 785,4 μL e passados para outro tubo de microcentrifuga. Neste último foram adicionados 30,6 μL do marcador de tamanho de fragmento ET-ROX 400 (*Amershan Biosciences*) e centrifugado, sendo distribuídos 8 μL dessa solução para cada poço da placa de injeção e completando-se com 2 μL do produto da PCR, totalizando 10 μL por amostra.

As amostras contidas na placa foram então desnaturadas a 94°C por 3 minutos e acondicionadas no gelo para que não renaturassem. Após uma pré corrida, a placa era então levada ao seqüenciador *MEGABACE 1000* previamente

programado para genotipagem. As condições de corrida foram: injeção a 3KV por 80 segundos e corrida a 8KV por 80 minutos. Após a eletroforese os produtos de PCR foram detectados e analisados pelo *Software Fragment Profiler 2.1* (Amershan Biosciences).

Primeiramente foi analisado o DNA normal de cada paciente para a identificação de alelos informativos (presença de dois alelos que apresentassem uma diferença de tamanho superior ou igual a 2pb). As amostras cujos marcadores apresentaram-se em homozigose na análise do sangue periférico foram consideradas não informativas para aquele marcador em específico.

Os marcadores que se mostraram informativos para cada paciente foram, em seguida, avaliados quanto à perda de heterozigose. O software *Fragment Profiler 2.1* fornece os valores de altura e área dos picos representativos dos alelos (Figura 4).

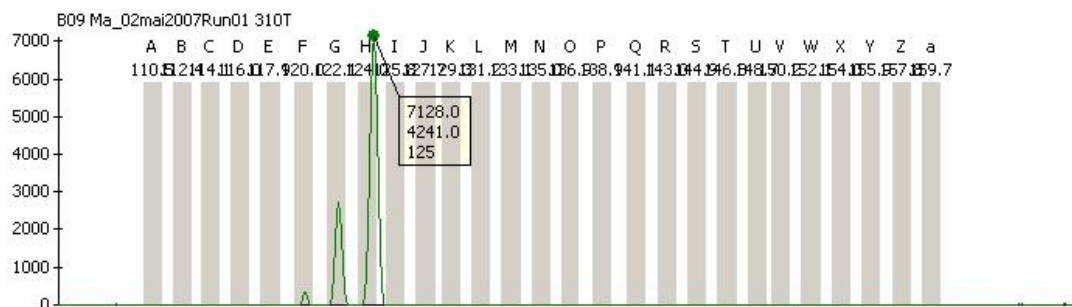
A LOH foi determinada matematicamente utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Altura do pico do alelo normal 2}}{\text{Altura do pico do alelo normal 1}}}{\frac{\text{Altura do pico do alelo tumoral 2}}{\text{Altura do pico do alelo tumoral 1}}} \quad \text{LOH} = \frac{\frac{\text{Área do pico do alelo tumoral 1}}{\text{Área do pico do alelo tumoral 2}}}{\frac{\text{Área do pico do alelo tumoral 1}}{\text{Área do pico do alelo tumoral 2}}}$$

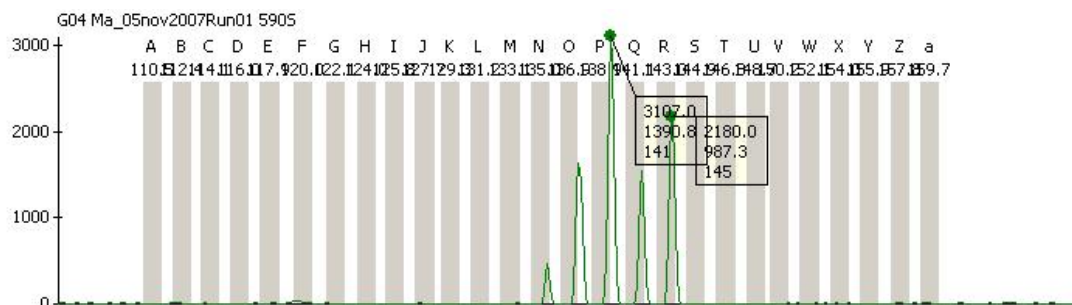
Sendo o alelo 1 aquele que possui menor tamanho em pares de bases, e o alelo 2 aquele que possui o maior tamanho. Um valor de $\text{LOH} \leq 0,6$ indica que a amostra tumoral apresenta significativa perda do alelo de maior tamanho, enquanto que um valor de $\text{LOH} \geq 1,6$ indica que a amostra tumoral apresenta perda do alelo de menor tamanho.

Foram consideradas como apresentando LOH apenas as amostras com valores inclusivos em ambos os cálculos. Casos com duvidas na interpretação dos resultados foram repetidos ou excluídos da amostragem final.

a)



b)



c)

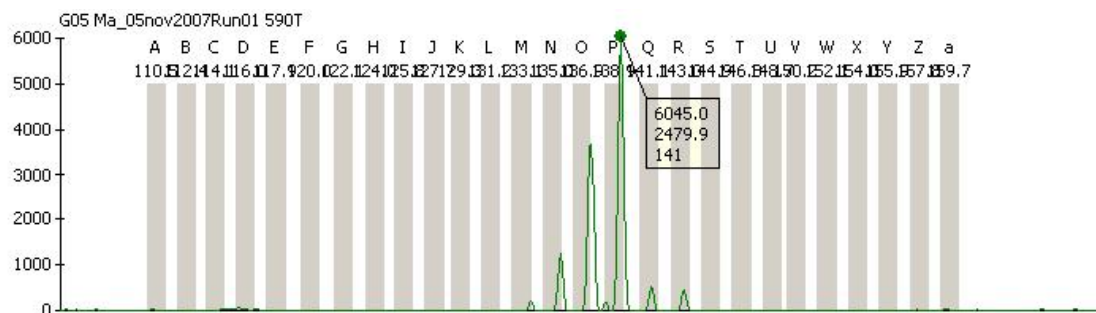


FIGURA 4: Exemplo de perfil dos alelos do marcador D3S1263. O pico do alelo é marcado mostrando os valores de altura, área e tamanho do alelo (pb), respectivamente. **a)** paciente homozigoto no sangue; **b)** paciente heterozigoto no sangue e com LOH no tumor **(c)**.

5.6 ANÁLISE DE INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE (MI)

Foram consideradas portadoras de instabilidade de microssatélite (MI) as amostras que tiveram redução ou expansão no tamanho de um dos alelos no tecido tumoral quando comparado ao DNA do sangue periférico (Figura 5).

As pacientes que apresentaram MI não foram analisadas quanto à perda de heterozigose, pois devido à metodologia utilizada neste trabalho não seria adequado aplicar as fórmulas matemáticas de análise de LOH para comparar alelos que sofreram alteração no número de bases, uma vez que o tamanho do fragmento influencia na altura e área dos picos. Dessa forma, os casos positivos para MI foram considerados não informativos nas análises de frequência de LOH.

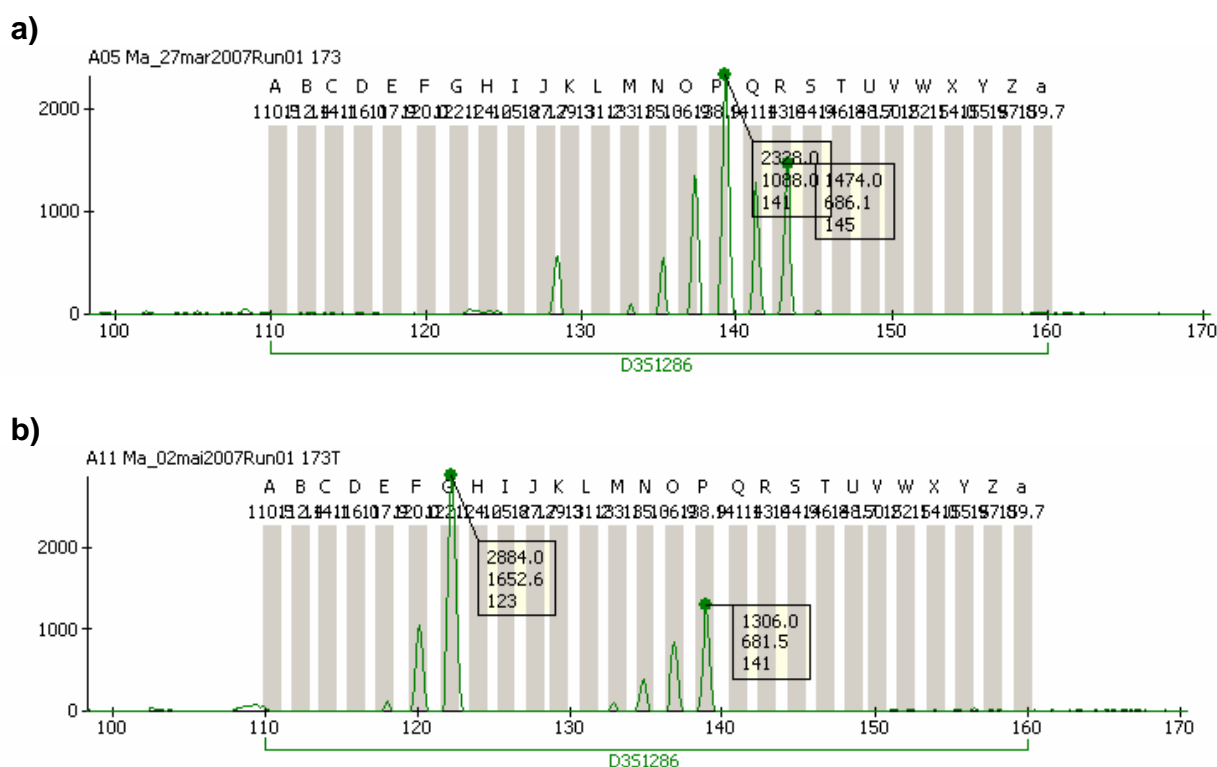


FIGURA 5: Exemplo de perfil dos alelos do marcador D3S1286. O pico do alelo é marcado mostrando os valores de altura, área e tamanho do alelo (pb), respectivamente. **a)** paciente heterozigota no sangue (alelos 141 e 145) ; **b)** instabilidade de microssatélite no tumor (alelos 123 e 141).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências de perda de heterozigose e instabilidade de microssatélites foram obtidas por contagem direta.

O teste do Qui-Quadrado de homogeneidade foi utilizado na comparação entre os parâmetros histopatológicos (presença de metástase em linfonodos regionais, grau de diferenciação tumoral, presença de receptores hormonais, e amplificação do oncogene *ERBB2*) e os resultados de LOH.

A análise de variância foi realizada para comparar as médias dos tamanhos dos tumores nas amostras com os resultados de LOH nos sete microssatélites analisados. O teste de BARTLETT foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias.

Todos os testes foram realizados de acordo com as fórmulas apresentadas por BEILGUELMAN (1988).

6. RESULTADOS

Foram analisados sete marcadores microssatélites em 3p (D3S1307, D3S1263, D3S1286, D3S1581, D3S1300, D3S1079 e D3S1274) em amostras de DNA tumoral e de sangue periférico de 142 pacientes com câncer de mama esporádico (Apêndice).

O número de pacientes analisadas para cada marcador microssatélite variou devido à dificuldades de amplificação do DNA das amostras (principalmente das amostras tumorais) para determinados marcadores.

A perda de heterozigose foi observada em todos os locos analisados. As freqüências variaram de 19,7% para o marcador D3S1263 a 45,9% para o marcador D3S1307. A LOH em pelo menos um loco em 3p foi observada em 91 das 142 pacientes (64,1%) analisadas.

A instabilidade de microssatélite (MI) foi observada em seis dos sete marcadores analisados, com freqüências variando de 1,9% para o marcador D3S1581 a 5,4% para o marcador D3S1300. Para o marcador D3S1274 não foi observada nenhuma MI.

As freqüências de perda de heterozigose (LOH) e instabilidade de microssatélite (MI) para cada um dos sete marcadores analisados estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Freqüências de LOH e MI obtidas nos sete marcadores de microssatélites em 3p

Marcador microssatélite (3p)	Pacientes analisados (n)	Casos informativos (n)/%	LOH (%) (LOH/casos informativos)	MI (%) (MI/casos informativos)
D3S1307	95	74/ 77,9	45,9 (34/74)	4,0 (3/74)
D3S1263	100	76/ 76,0	19,7 (15/76)	5,3 (4/76)
D3S1286	98	85/ 86,7	29,4 (25/85)	2,3 (2/85)
D3S1581	130	106/ 81,5	29,2 (31/106)	1,9 (2/106)
D3S1300	101	74/ 73,3	25,7 (19/74)	5,4 (4/74)
D3S1079	65	38/ 58,5	36,8 (14/38)	5,3 (2/38)
D3S1274	114	59/ 51,8	37,3 (22/59)	0

Legenda: LOH: perda de heterozigose; MI: instabilidade de microssatélite

6. 1 ANÁLISES DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

Foram realizadas análises entre os resultados de LOH e os parâmetros histopatológicos (tamanho e tipo histológico do tumor, presença de receptores hormonais, grau de diferenciação tumoral, presença de metástases em linfonodos regionais e amplificação do oncogene *ERBB2*). Somente foram incluídas as pacientes que possuíam informação para o parâmetro analisado, ocasionando uma redução do tamanho amostral. A análise dos parâmetros histopatológicos não foi realizada com os resultados de MI, devido ao pequeno número de casos positivos observados.

A Tabela 7 apresenta as médias dos tamanhos dos tumores das pacientes e os resultados de LOH para cada marcador. A análise de variância foi realizada para comparar os dados apresentados nesta tabela, não tendo sido observada diferença significativa para nenhuma das variações analisadas (Tabela 8). O teste de Bartlett, para avaliar a homogeneidade das variâncias, apresentou um valor não significativo ($\chi^2_{(13) \text{ corr.}} = 9,25$; $P > 0,70$).

Tabela 7. Médias dos tamanhos dos tumores e número de pacientes que apresentaram ou não LOH para os sete marcadores de microssatélites em 3p

Marcador	Médias e desvios		Número de pacientes	
	LOH +	LOH -	LOH +	LOH -
	média ± DP	média ± DP		
D3S1307	3,80 ± 1,81	3,26 ± 1,52	27	30
D3S1263	3,5 ± 1,2	3,93 ± 1,74	10	50
D3S1286	3,95 ± 1,71	3,73 ± 1,81	22	45
D3S1581	3,5 ± 1,61	3,53 ± 1,68	30	60
D3S1300	3,20 ± 1,64	3,7 ± 1,62	15	47
D3S1079	4,0 ± 2,3	3,59 ± 1,46	10	18
D3S1274	4,17 ± 1,94	3,5 ± 1,4	17	32

Legenda: LOH +: apresenta perda de heterozigose; LOH -: não apresenta perda de heterozigose; DP: desvio padrão

Tabela 8. Análise da variância para a comparação das médias dos tamanhos dos tumores das pacientes e resultados de LOH nos sete marcadores de microssatélites em 3p

Varição	G.L.	SQ	S ² (x)	F	G.L.	P
Entre LOH+ e LOH -	1	0,04	0,04	0,014	1; 399	P>0,05
Entre marcadores	6	5,95	0,99	0,35	6; 399	P>0,05
Interação	6	15,73	2,62	0,93	6; 399	P>0,05
E.T.G	13	21,72	1,67	0,59	13; 399	P>0,05
Resíduo	399	1123,75	2,82			
Total	412	1145,47				

Legenda: LOH +: apresenta perda de heterozigose; LOH -: não apresenta perda de heterozigose
ETG: entre todos os grupos

O teste do qui-quadrado foi realizado para a análise dos demais parâmetros histopatológicos (tipo histológico do tumor, receptor de estrogênio e progesterona, grau de diferenciação tumoral, presença de metástases em linfonodos regionais e amplificação do oncogene *ERBB2*).

Em dois dos parâmetros analisados, tipo histológico do tumor e presença do receptor de estrogênio observou-se resultados estatisticamente significativos para o marcador microssatélite D3S1274 ($\chi^2_2=5,42$; $P<0,05$; $\chi^2_2=8,12$; $P<0,01$, respectivamente) (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com carcinoma ductal, lobular e tipos histológicos raros nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2

	D3S1307		D3S1263		D3S1286		D3S1581		D3S1300		D3S1079		D3S1274	
	LOH+	LOH-	LOH+	LOH-	LOH+	LOH-	LOH+	LOH-	LOH+	LOH-	LOH+	LOH-	LOH+	LOH-
CDI	28	33	11	49	21	47	27	60	16	45	12	22	14	30
CLI	4	5	3	7	1	7	2	7	2	4	1	2	6	2
THR	2	2	0	4	1	5	3	6	0	7	0	1	2	4
Qui	$\chi^2_2=0,04$		$\chi^2_2=1,75$;		$\chi^2_2=1,61$;		$\chi^2_2=0,34$;		$\chi^2_2=2,63$;		$\chi^2_1=0,54$;		$\chi^2_2=5,42$;	
Quadrado	P>0,80		P>0,10		P>0,20		P>0,50		P>0,10		P>0,30		P<0,05	

Legenda: LOH +: apresenta perda de heterozigose; LOH -: não apresenta perda de heterozigose; CDI: carcinoma ductal invasor; CLI: carcinoma lobular invasor; THR: tipos histológicos raros.

Tabela 10. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com receptor de estrogênio positivo ou negativo nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2

Marcador	LOH +		LOH -		Qui-quadrado
	RE +	RE -	RE +	RE -	
D3S1307	13	6	19	4	$\chi^2_1=1,15$; P>0,20
D3S1263	8	0	30	7	$\chi^2_1=1,79$; P>0,10
D3S1286	10	3	28	7	$\chi^2_1=0,05$; P>0,80
D3S1581	15	3	35	9	$\chi^2_1=0,12$; P>0,70
D3S1300	10	0	24	9	$\chi^2_1=3,45$; P>0,05
D3S1079	5	2	14	3	$\chi^2_1=0,36$; P>0,50
D3S1274	11	0	10	10	$\chi^2_1=8,12$; P<0,01

Legenda: LOH +: apresenta perda de heterozigose; LOH -: não apresenta perda de heterozigose; RE+: positivo para receptor de estrogênio; RE-: negativo para receptor de estrogênio.

Os demais resultados obtidos não apresentaram significância estatística para os seguintes parâmetros: receptor de progesterona, grau de diferenciação tumoral, presença de metástases nos linfonodos regionais, e amplificação do oncogene *ERBB2*, tanto quando cada marcador foi analisado isoladamente (Tabelas 11, 12, 13 e 14), como quando analisados em conjunto (receptor de progesterona: $\chi^2_1 = 0,001$; $P > 0,95$; grau de diferenciação tumoral: $\chi^2_2 = 0,41$; $P > 0,70$; envolvimento de linfonodos: $\chi^2_1 = 0,17$; $P > 0,50$; e amplificação do *ERBB2*: $\chi^2_1 = 1,9$; $P > 0,10$).

Tabela 11. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com receptor de progesterona positivo ou negativo nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2

Marcador	Com LOH		Sem LOH		Qui-quadrado
	RP +	RP -	RP +	RP -	
D3S1307	10	7	15	4	$\chi^2_1 = 1,71$; $P > 0,10$
D3S1263	4	1	24	11	$\chi^2_1 = 0,27$; $P > 0,50$
D3S1286	6	4	22	10	$\chi^2_1 = 0,26$; $P > 0,50$
D3S1581	11	5	26	12	$\chi^2_1 = 0,001$; $P > 0,95$
D3S1300	5	2	21	10	$\chi^2_1 = 0,04$; $P > 0,80$
D3S1079	4	1	12	3	$\chi^2_1 = 0$
D3S1274	8	2	10	9	$\chi^2_1 = 2,08$; $P > 0,10$

Legenda: LOH +: apresenta perda de heterozigose; LOH -: não apresenta perda de heterozigose; RP+: positivo para receptor de progesterona; RP-: negativo para receptor de progesterona.

Tabela 12. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com graus I, II, e III de diferenciação tumoral nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2

Marcador	LOH +			LOH -			Qui-quadrado
	G. I	G. II	G. III	G. I	G. II	G. III	
D3S1307	7	15	10	5	21	10	$\chi^2_2 = 1,10$; $P > 0,50$
D3S1263	2	8	1	9	33	13	$\chi^2_2 = 1,17$; $P > 0,50$
D3S1286	3	14	3	11	28	12	$\chi^2_2 = 1,38$; $P > 0,50$
D3S1581	5	14	7	13	41	16	$\chi^2_2 = 0,21$; $P > 0,90$
D3S1300	1	9	5	8	25	16	$\chi^2_2 = 0,93$; $P > 0,50$
D3S1079	1	7	5	6	12	3	$\chi^2_2 = 3,70$; $P > 0,10$
D3S1274	3	11	4	7	17	8	$\chi^2_2 = 0,32$; $P > 0,80$

Legenda: LOH +: apresenta perda de heterozigose; LOH -: não apresenta perda de heterozigose; G.I: grau I, G.II: grau II; G.III: grau III de diferenciação tumoral.

Tabela 13. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com presença e ausência de metástases em linfonodos regionais nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2

Marcador	LOH +		LOH -		Qui-quadrado
	MLR +	MLR -	MLR +	MLR -	
D3S1307	11	18	10	23	$\chi^2_1 = 0,39$; $P > 0,50$
D3S1263	4	7	27	28	$\chi^2_1 = 0,59$; $P > 0,30$
D3S1286	9	10	25	28	$\chi^2_1 = 0,0003$; $P > 0,95$
D3S1581	12	15	30	38	$\chi^2_1 = 0,001$; $P > 0,95$
D3S1300	8	7	19	27	$\chi^2_1 = 0,66$; $P > 0,30$
D3S1079	4	8	10	13	$\chi^2_1 = 0,34$; $P > 0,50$
D3S1274	11	7	12	20	$\chi^2_1 = 2,58$; $P > 0,10$

Legenda: LOH +: apresenta perda de heterozigose; LOH -: não apresenta perda de heterozigose; MLR+: presença de metástase em linfonodos regionais; MLR-: ausência de metástase em linfonodos regionais.

Tabela 14. Número de pacientes que apresentaram ou não LOH e com presença ou ausência de amplificação do oncogene *ERBB2* nos sete marcadores analisados e resultados do teste de χ^2

Marcador	LOH +		LOH -		Qui-quadrado
	<i>ERBB2</i> +	<i>ERBB2</i> -	<i>ERBB2</i> +	<i>ERBB2</i> -	
D3S1307	7	12	8	14	$\chi^2_1=0,001$; $P>0,95$
D3S1263	1	7	15	22	$\chi^2_1=2,26$; $P>0,10$
D3S1286	4	9	10	23	$\chi^2_1=0,001$; $P>0,95$
D3S1581	3	12	19	24	$\chi^2_1=2,76$; $P>0,05$
D3S1300	5	5	12	19	$\chi^2_1=0,40$; $P>0,50$
D3S1079	1	6	5	12	$\chi^2_1=0,61$; $P>0,30$
D3S1274	3	11	8	10	$\chi^2_1=1,85$; $P>0,10$

Legenda: LOH +: apresenta perda de heterozigose; LOH -: não apresenta perda de heterozigose; *ERBB2* +: positivo para amplificação do oncogene *ERBB2* ; *ERBB2* -: negativo para amplificação do oncogene *ERBB2*.

7. DISCUSSÃO

A carcinogênese mamária é um processo complexo que envolve inúmeras alterações genéticas entre elas a baixa expressão de genes supressores tumorais que codificam para proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e nos mecanismos de adesão celular e apoptose (INGVARSSON, 2004).

A perda de regiões cromossômicas é uma das alterações mais freqüentemente observadas no câncer de mama (MYAKIS e SPANDIDOS, 2002) e é uma importante ferramenta na localização de genes supressores tumorais. As análises de LOH combinadas às análises de parâmetros histopatológicos marcadores da agressividade tumoral podem auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão desses tumores e no desenvolvimento de novos marcadores moleculares para uso clínico. Segundo PEREZ-ORDOÑEZ *et al.* (2006), a análise de LOH, conjuntamente com outros marcadores pode ser um importante fator na predição de risco de progressão tumoral quando se avalia lesões pré-cancerosas, desenvolvimento de tumores secundários e óbito. A aplicação da LOH como marcador prognóstico através da técnica de genotipagem em seqüenciador automático oferece vantagens por ser um método que possibilita a utilização de diferentes marcadores simultaneamente, podendo analisar um grande número de amostras em um único ensaio laboratorial (MATSUMOTO *et al.*, 2000).

Em cânceres de mama hereditários as pacientes comumente apresentam mutação germinativa em um alelo do gene *BRCA1* (ou *BRCA2*) e a perda do alelo funcional como mecanismo de inativação do gene (OLDENBURG *et al.*, 2007). Em cânceres esporádicos a inativação de genes supressores tumorais acontece freqüentemente através de mutações gênicas ou mecanismos epigenéticos e LOH (THIAGALINGAM *et al.*, 2002). Segundo YANG *et al.* (2002) a hipermetilação e a LOH são os dois principais mecanismos de perda de função de genes supressores em carcinomas mamários esporádicos, no entanto ainda não se sabe quais dos eventos ocorrem primeiro durante a tumorigênese (THIAGALINGAM *et al.*, 2002).

A perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 3 (3p) é frequentemente observada em carcinomas mamários e em muitos outros tipos de cânceres esporádicos, como o de pulmão, cabeça e pescoço, tireóide, útero, ovário, esôfago, renal, gástrico e em neuroblastomas (revisado em YAMAMOTO *et al.*, 2007) indicando a localização de genes supressores tumorais com importante função na carcinogênese.

Em nosso estudo, a LOH foi observada nos sete locos analisados e 91 (64,1%) das 142 pacientes informativas apresentaram perda em pelo menos um deles. A maior frequência de LOH encontrada foi de 45,9% (34/74) para o marcador D3S1307 localizado em 3p26.3.

A perda de marcadores polimórficos nessa região é descrita em muitos tipos de câncer como: pulmão, renal, mamário e outros tumores sólidos (ZABAROVSKY *et al.*, 2002; HARTIKAINEN *et al.*, 2005; TAI *et al.*, 2006). RIMESSI *et al.* (1994) demonstraram que genes localizados na região 3p25-p26 suprimem o crescimento de células tumorais, e estudos mostram que deleções nessa região têm valor prognóstico para alguns tipos de câncer (MATSUMOTO *et al.*, 2000; HIRANO *et al.*, 2001).

Os achados de LOH em 3p25-p26 em neoplasias associadas com a síndrome de Von Hippel Lindau (especialmente de origem renal) sugeriram o gene *VHL* como supressor tumoral (WHALEY *et al.*, 1994). Tais observações foram confirmadas por estudos *in vitro* quando se demonstrou que a reintrodução de uma cópia normal do gene *VHL* em células mutantes resulta em regressão do fenótipo tumoral (ILIOPOULOS *et al.*, 1995).

Foi demonstrado que a ausência do gene *VHL* resulta em aumento da transcrição de genes estimulados por sinais de hipóxia, ou seja, baixo teor de oxigênio nas células (LONERGAN *et al.*, 1998; MAXWELL *et al.*, 1999). Sabe-se que as proteínas que são ativadas por hipóxia tentam restaurar ou se adaptar ao novo nível de oxigenação tissular através de vários mecanismos, entre eles a indução da angiogênese. Isto pode explicar o fato de que os tumores componentes da síndrome de Von Hippel Lindau são altamente vascularizados. Além dos efeitos do gene *VHL* na regulação de sinais de hipóxia, outras funções

têm sido atribuídas a este gene, como a organização da matriz extracelular, o controle do ciclo celular e a estabilização de certos genes no nível pós-transcricional (PAUSE *et al.*, 1998; KONDO e KAE LIN, 2001).

Recentemente, ZIA *et al.* (2006) demonstraram que a presença do gene *VHL* inibe a capacidade de invasão e migração de linhagens de câncer de mama sugerindo o envolvimento deste gene na carcinogênese mamária. Quando analisaram a expressão do gene *VHL* em 124 amostras de tumores de mama primários, esses autores encontraram associação entre baixos níveis do mRNA do gene e parâmetros histopatológicos indicadores de agressividade tumoral como grau de diferenciação do tumor e presença de metástases em linfonodos.

A alta taxa de LOH (45,9%) do marcador D3S1307 localizado em 3p26.3 observada em nosso estudo nos permite sugerir o gene *VHL* como candidato a supressor tumoral envolvido com a carcinogênese mamária. Porém não encontramos associação significativa entre a perda do marcador e nenhum dos parâmetros histopatológicos analisados, sugerindo que a perda dessa região não está envolvida com a progressão dos tumores de mama.

Outro gene localizado próximo a essa região é o *FANCD2*, mapeado em 3p25.3 (HEJNA *et al.*, 2000). O gene codifica para uma proteína que interage com o gene *BRCA1* e é essencial no processo de resposta a danos do DNA (BARROSO *et al.*, 2006). Foi demonstrado que a proteína codificada pelo gene *FANCD2* é expressa em células proliferativas da mama normal, e que a inativação do gene causa o desenvolvimento de tumores de mama em camundongos (HOLZEL *et al.*, 2003; HOUGHTALING *et al.*, 2003).

Em nosso estudo analisamos a perda do marcador microssatélite D3S1263 que está localizado em 3p25.3 e observamos LOH em 15 (19,7%) das 76 pacientes informativas para esse locus. Essa frequência (19,7%) é bastante próxima à descrita por VAN DER GROEP *et al.* (2008) de 19% para a perda completa da expressão do gene *FANCD2* em 96 amostras de tumores de mama esporádicos. Dessa forma sugerimos o gene *FANCD2* como candidato a supressor tumoral com função na tumorigênese mamária e a LOH como principal mecanismo de inativação deste gene.

A região 3p24 apresenta freqüentes perdas em muitos tipos de tumor como cabeça e pescoço, próstata, pulmão e mama (MULLER *et al.*, 2006; TAI *et al.*, 2006; FU *et al.*, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2007). Um candidato a supressor tumoral localizado nesta região é o gene *RARB* que codifica para o receptor do ácido retinóico β 2. Este gene atua como fator transcricional ligante-dependente modulando a expressão dos genes responsivos ao ácido retinóico, um metabólito ativo da vitamina A e β -caroteno que tem importante papel no controle da proliferação e diferenciação celular e na regulação da apoptose (SPORN *et al.*, 1994; ALTUCCI e GRONEMEYER, 2001). Estudos sugerem que o *RARB* desempenha importante papel na limitação do crescimento de muitos tipos de células e que a perda da atividade regulatória deste gene está associada com a tumorigênese (YANG *et al.*, 2001).

O marcador microssatélite D3S1286 está localizado em 3p24.3 e nosso estudo encontrou perda desse marcador em 29,4% (25/85) das pacientes analisadas. Uma freqüência de perda semelhante à nossa foi descrita por MATSUMOTO *et al.* (2000) que observaram perda deste marcador em 93 (27,2%) das 342 amostras de tumores de mama.

YANG *et al.* (2001a) analisaram a LOH na região 3p24 utilizando 3 marcadores microssatélites, entre eles o D3S1286, e encontraram LOH desse marcador em 24% dos 52 tumores de mama analisados, resultado também semelhante ao encontrado em nosso estudo (29,4%) para o mesmo marcador. Esses autores analisaram a expressão da proteína do *RARB* e encontraram perda da expressão em 42% das amostras, levando-os a concluir que a LOH em 3p24 não é o único mecanismo de inativação do gene *RARB* nestes tumores. Como mutações nesse gene não têm sido observadas (WIDSCHWENDTER *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2001b) é possível que a inativação bialélica ocorra por mecanismos epigenéticos em ambos os alelos ou através da inativação epigenética de um alelo e a deleção do alelo remanescente (YANG *et al.*, 2001b).

Esses resultados também podem indicar que outros genes presentes nessa região, e não somente o *RARB*, estejam envolvidos com a patogênese do câncer de mama, por exemplo, o gene *THRB* localizado em 3p24.3 (ALBERTSON;

SHERRINGTON e RABBITTS, 1989). O proteína codificada por este gene pode atuar como ativador transcricional na presença do hormônio tireoidiano T3, e como silenciador na ausência do mesmo (DAMM *et al.* 1989). SILVA *et al.*, (2002) demonstraram que a expressão do *THRB* encontra-se alterada em tumores de mama sugerindo que a desregulação do gene está envolvida no desenvolvimento dessa neoplasia.

Deleções em 3p21 são encontradas em amostras de tumores de mama indicando o envolvimento dessa região na patogênese da doença (MARTINEZ *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2002; ZABAROVSKY *et al.*, 2002). MAITRA *et al.* (2001) analisaram 9 marcadores microssatélites em 3p21 em amostras de câncer de mama e observaram freqüências de LOH que variaram de 25% a 50%.

Em nosso estudo, a LOH do marcador D3S1581 em 3p21.3 foi observada em 31 das 106 (29,2%) amostras informativas, evidenciando a importância desta região e a possível localização de genes supressores com função na tumorigênese mamária.

O gene *RASSF1* mapeado em 3p21 é o mais estudado como supressor tumoral para esta região (MARTINEZ *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2002; ZABAROVSKY *et al.*, 2002). Sua função está relacionada com a regulação da proliferação celular através da inibição da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (SHIVAKUMAR *et al.*, 2002). Outros genes como *RBM5* e *BAP1*, ambos localizados em 3p21.3, também têm sido associados com a carcinogênese mamária. O gene *RBM5* desempenha importante papel na formação do tumor, proliferação e morte celular (LERMAN e MINNA, 2000; OH *et al.*, 2002; RINTALAMAKI e SUTHERLAND, 2004). MOURTADA-MAARABOUNI *et al.* (2003) demonstraram que a superexpressão do gene suprimiu a proliferação de células de linhagem celular de câncer de mama, tanto por indução da apoptose, quanto por extensão da fase G1 do ciclo celular. O gene *BAP1* codifica para uma proteína que se liga ao *BRCA1* atuando na cascata de regulação do crescimento celular e sendo potencial mediador da supressão tumoral em cânceres de mama (COUPIER *et al.*, 2005).

Deleções na região 3p14.2 são muito freqüentes em cânceres de pulmão e renal, sendo também observadas em outros tipos de tumor como mama, cabeça e pescoço, gastrointestinal, esôfago e cervical (revisado em ZABAROVSKY *et al.*, 2002).

A presença do gene *FHIT* em 3p14.2 e as altas freqüências de LOH nessa região em carcinomas mamários sugerem seu envolvimento na patogênese dessa doença. Alterações genéticas que causam a redução na expressão do *FHIT* são encontradas em 30% dos tumores de mama (AHMADIAN *et al.*, 1997; GATALICA *et al.*, 2000) e são devidas à deleções internas ou hipermetilação, uma vez que mutações pontuais são raras neste gene (GATALICA *et al.*, 2000; HANBY *et al.*, 2000).

O marcador microssatélite D3S1300 está localizado dentro do intron 5 do gene *FHIT* sendo um importante marcador no estudo desta região. MAN *et al.* (1996) detectaram a LOH desse marcador em 44% das amostras de câncer de mama. MAITRA *et al.* (2001) observaram perda do D3S1300 em 35% das amostras de carcinomas mamários.

Em nosso estudo, foi observada perda do marcador D3S1300 em 19 (25,7%) das 74 pacientes informativas para esse loco, o que também permite sugerir o envolvimento do gene *FHIT* na tumorigênese mamária. Uma freqüência de LOH semelhante à encontrada em nosso estudo foi também descrita em outro trabalho de nosso grupo (SANTOS *et al.*, 2004) que encontraram a perda desse marcador em 6 das 25 (24%) pacientes analisadas.

CHEN *et al.* (1994) identificaram duas regiões que são independentemente deletadas em cânceres mamários: 3p13-p14 e 3p24-p26. Em nosso estudo, a perda do marcador D3S1079, localizado em 3p13, foi observada em 36,8% (14/38) das pacientes, evidenciando a importância desta região na carcinogênese da mama.

O marcador D3S1274 está localizado dentro do loco do gene *ROBO1*, mapeado em 3p12.3 por SUNDARESAN *et al.* (1998b) e estudos têm relacionado a função desse gene à supressão de tumores mamários (SUNDARESAN *et al.*, 1998a; MARTINEZ *et al.*, 2001). ZABAROVSKY *et al.* (2002) observaram a

hipermetilação do gene *ROBO1* em 19% dos tumores de mama invasivo. Além disso, 80% dos tumores que apresentaram-se hipermetilados para este gene também apresentaram perda alélica para marcadores da região 3p12, corroborando com a hipótese dos dois eventos de KNUDSON para a inativação de genes supressores tumorais (ZABAROVSKY *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, a LOH do marcador D3S1274 foi observada em 22 (37,3%) das 59 pacientes informativas. MAITRA *et al.* (2001), encontraram perda do mesmo marcador em 20% das amostras de tumor primário de mama. Quando analisaram em conjunto outros dois marcadores da região 3p12 além do D3S1274, os autores encontraram frequência de LOH de 35%.

A análise do marcador D3S1274, realizada neste estudo, em relação ao tipo histológico dos tumores (ductal, lobular e tipos raros) indicou um valor de χ^2 estatisticamente significativo ($\chi^2_2=5,42$; $P<0,05$), sendo que a principal diferença entre o observado e o esperado ocorreu no carcinoma lobular com os χ^2 parciais (4,67) representando 86% do valor do χ^2 total (5,42). A LOH do marcador D3S1274 foi observada em 6 (75%) das 8 pacientes com carcinoma lobular informativas para esse locus. Esses resultados sugerem um possível envolvimento da região 3p12 no desenvolvimento do carcinoma lobular.

Os carcinomas lobulares invasivos (CLI) representam cerca de 14% de todos os cânceres de mama invasivos (SINGLETARY *et al.*, 2005). Esses tumores possuem características morfológicas e genéticas que os distinguem dos carcinomas ductais invasivos (CDI) estando associados com aumento de risco de doença bilateral, multifocalidade, e uma propensão em desenvolver metástases em sítios não usuais, sendo o mais comum, o trato gastro-intestinal (EL KHOURY *et al.*, 2004; SAVANIS *et al.*, 2006).

Os achados de LOH em carcinomas lobulares envolvem principalmente a região 16q22.1, onde encontra-se mapeado o gene da *E-CADERINA* (*CDH1*) (MANSOURI *et al.*, 1987). O complexo da E-CADERINA possui importante função nos mecanismos de adesão célula a célula e na manutenção da arquitetura tecidual (WIJNHOFEN *et al.*, 2000). Na glândula mamária normal, que é composta por uma bicamada formada por células luminais e mioepiteliais, a E-CADERINA é

responsável pela adesão entre as células luminais (HINCK, 2004). SARRIÒ *et al.* (2003) observaram a LOH do gene *CDH1* em 30 (73%) das 41 amostras de carcinoma lobular invasivo.

Estudos mostram que o gene *ROBO1* é expresso nas células da camada mioepitelial da mama (STRICKLAN *et al.*, 2006) e sua função é relacionada com os mecanismos de interação entre as células. Segundo CHUNG *et al.* (1995) a inativação do gene resultaria no descontrole da arquitetura tecidual que acontece durante o desenvolvimento do câncer, fenótipo semelhante ao provocado pela perda do gene *CDH1*.

A alta frequência de perda do marcador intragênico do *ROBO1* em carcinomas lobulares encontrada neste estudo (75%), e o envolvimento deste gene nos mecanismos de adesão celular semelhante à molécula da E-CADERINA, sugerem que o gene *ROBO1* pode ter uma função relevante no desenvolvimento deste tipo de tumor.

A literatura mostra que o perfil molecular dos CLI, embora não seja exclusivo dos carcinomas lobulares, é distinto dos outros tipos de tumores, são considerados de bom prognóstico, pois geralmente são negativos para amplificação do *ERBB2*, e positivos para receptor de estrogênio e progesterona (ARPINO *et al.*, 2004).

Na nossa amostra, todas as pacientes com carcinoma lobular eram positivas para os receptores de estrogênio e progesterona. Isto pode explicar porque a perda do marcador D3S1274, que ocorreu com maior frequência nos carcinomas lobulares, foi observada somente nas pacientes RE positivas, apresentando um valor de χ^2 significativo ($\chi^2_1=8,12$; $P<0,01$) na análise entre a perda deste marcador e a presença do receptor de estrogênio. Deve-se salientar que o resultado da análise do mesmo marcador em relação ao receptor de progesterona, apesar de não ser estatisticamente significativa ($\chi^2_1=2,08$; $P>0,10$), apresentou o maior valor do χ^2 entre os marcadores analisados (Tabela 10). Esses resultados provavelmente são consequência da maior frequência de perda da região 3p12.3 nas pacientes com carcinoma lobular que se caracterizam por serem positivas para receptores de estrogênio e progesterona.

As demais análises entre os resultados de LOH e os parâmetros histopatológicos (tamanho do tumor, presença de receptor de progesterona, grau de diferenciação tumoral, presença de metástases em linfonodos regionais e amplificação do oncogene *ERBB2*) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos sete marcadores analisados, sugerindo que a perda dessas regiões não se relaciona com a maior agressividade tumoral. No entanto, os resultados obtidos nas análises de grau de amplificação do oncogene *ERBB2* para D3S1581 ($\chi^2_1=2,76$; $P>0,05$) e presença do receptor de estrogênio para D3S1300 ($\chi^2_1=3,45$; $P>0,05$) devem ser analisados em amostras de tamanho mais consistente para reavaliarmos o envolvimento dessas regiões com as características patológicas dos tumores de mama.

A associação da LOH em 3p com parâmetros histopatológicos e clínicos em pacientes com carcinoma mamário ainda não está bem definida na literatura. SOURVINOS *et al.* (2001), assim como em nosso estudo, não encontraram associação entre a perda da região 3p25-p26 em amostras de câncer de mama esporádico e parâmetros clínicos e histopatológicos da doença.

Em relação à região 3p25, VAN DER GROEP *et al.* (2008) encontraram associação estatisticamente significativa entre a expressão do gene *FANCD2* (mapeado em 3p25.3) e fatores associados à proliferação celular, indicando que a ausência da proteína estaria relacionada com um pior prognóstico da doença e a função fisiológica do gene estaria relacionada com o reparo do DNA em células proliferativas. Segundo os autores, o gene teria valor prognóstico independente do estágio e grau histológico dos tumores, uma vez que o estágio tumoral não está fortemente relacionado com o índice proliferativo, e o grau histológico inclui outras duas características (formação tubular e pleomorfismo nuclear) além da atividade mitótica. Isso poderia explicar porque em nosso estudo não foi observada diferença significativa entre a perda da região 3p25.3 e o grau histológico dos tumores ($\chi^2_2 = 1,17$; $P>0,50$).

Em alguns estudos observou-se diferenças estatisticamente significativas entre a perda em 3p e parâmetros histopatológicos da doença, por exemplo, MARTINEZ *et al.* (2001) encontraram associação entre a perda da região 3p21-

p22 e a perda de receptores de estrogênio e progesterona. No entanto, assim como no nosso estudo, os autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre a presença de metástases em linfonodos e a LOH em 3p.

Alguns estudos relacionam a perda do gene *FHIT* com uma maior agressividade da doença. INGVARSSON *et al.* (2001) encontraram associação entre a perda do gene *FHIT* e parâmetros indicadores de agressividade tumoral e menor sobrevida das pacientes. CAMPIGLIO *et al.* (1999) analisaram a expressão do gene *FHIT* em 185 amostras de câncer de mama e observaram que a diminuição ou ausência da proteína codificada pelo gene está associada com maior proliferação e aumento do tamanho do tumor.

Como já citado, para que fossem realizadas as análises entre os parâmetros histopatológicos das pacientes houve uma redução do tamanho da amostra devido à falta de algumas informações, e, assim, tanto a presença de significância estatística encontrada nas análises de presença do receptor de estrogênio e tipo histológico do tumor para o microssatélite D3S1274, quanto à ausência de significância para as demais análises, podem ter sido influenciadas pela diminuição de poder estatístico, o que determina cautela na avaliação dos resultados apresentados. Entretanto, os mesmos devem ser reavaliados em amostras mais consistentes pela relevância que podem representar.

A instabilidade de microssatélite (MI), definida como a inserção ou deleção de uma ou mais unidades de repetição, é um fenótipo associado a mutações em genes de reparo e erros de pareamento do DNA. A ocorrência da MI em regiões codificantes de genes ou áreas do genoma envolvidas com a regulação da transcrição pode resultar no desenvolvimento do câncer (RICHARDS *et al.*, 1992).

As instabilidades de microssatélites (MI) foram associadas com a carcinogênese pela primeira vez em pacientes com câncer de cólon, com uma frequência de 28% (THIBODEAU *et al.*, 1993). Em pacientes com HNPCC (síndrome de câncer colorretal hereditária sem polipose) as frequências de MI chegam a 70% (AALTONEN *et al.*, 1993). A presença de MI embora em frequências menores, também tem sido associada a outros tipos de cânceres,

como gástrico, endometrial, pulmão, bexiga e mama (RUSH *et al.*, 1997; MAITRA *et al.*, 2001; FU *et al.*, 2007).

A presença de instabilidade microssatélites em cânceres de mama ainda não está bem definida na literatura. Alguns trabalhos descrevem o envolvimento da MI em carcinomas mamários, como os de YEE *et al.* (1994) que encontraram frequência de 20% para marcadores localizados nos cromossomos 15, 18 e X; e RUSH *et al.* (1997) que observaram frequência de 28,2% para marcadores no cromossomo 17. No entanto, ANBAZHAGAN *et al.* (1999) em análise de 267 tumores de mama invasivos, analisando um total de 104 marcadores localizados em 11 cromossomos (1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 16 e 17), não encontraram nenhum caso de instabilidade de microssatélite.

A MI envolvendo o braço curto do cromossomo 3 é descrita em carcinomas de mama (MAITRA *et al.*, 2001; FU *et al.*, 2007) e lesões pré-cancerígenas (FU *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a instabilidade de microssatélite foi observada em seis dos sete marcadores analisados, com frequências variando de 1,9% para o marcador D3S1581 a 5,4% para o marcador D3S1300. Para o marcador D3S1274 não foi observada nenhuma MI.

Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por MAITRA *et al.* (2001). Os autores também não encontraram nenhum caso de MI para o marcador D3S1274. Para o marcador D3S1300, os mesmos autores observaram instabilidade em uma (3%) das 33 pacientes informativas. No nosso estudo observamos uma frequência de MI de 5,4 % (4/75) para o mesmo marcador.

As baixas frequências de MI encontradas em nosso trabalho sugerem que embora as instabilidades de microssatélites estejam presentes em tumores mamários, elas não estão envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama. É provável que as mudanças observadas em microssatélites sejam somente marcadores da instabilidade genômica e consequência dos erros de pareamento dos cromossomos.

Em relação aos resultados de LOH nossos dados sugerem que a perda de regiões cromossômicas em 3p representa uma alteração importante durante a carcinogênese mamária, e provavelmente resulta na inativação de genes

supressores tumorais envolvidos no desenvolvimento desta neoplasia. A perda de marcadores moleculares que se localizam dentro ou próximos aos genes: *VHL*, *FANCD2*, *THRB*, *RARB*, *RBM5*, *BAP1*, *RASSF1*, *FHIT* e *ROBO1*, observada em nosso estudo, nos permite sugerir esses nove genes como candidatos a supressores de tumor com função relevante na etiologia do câncer de mama.

8. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a região cromossômica 3p está envolvida com o desenvolvimento de carcinomas mamários. As frequências de LOH encontradas em todas as sub-regiões estudadas, semelhantes a outros estudos descritos na literatura, indicam a existência de genes supressores tumorais com função relevante na etiologia e progressão dos carcinomas de mama. Uma revisão da literatura indicou um total de nove genes candidatos a supressores tumorais localizados dentro ou próximo aos marcadores analisados neste estudo: *VHL*, *FANCD2*, *THRB*, *RARB*, *RBM5*, *BAP1*, *RASSF1*, *FHIT* e *ROBO1*. Nossos resultados também sugerem o envolvimento desses genes no desenvolvimento das neoplasias da mama.

Uma alta frequência, com significância estatística, de perda do marcador D3S1274 (intragênico do *ROBO1*) foi encontrada em carcinomas lobulares (75%) quando comparada à encontrada em carcinomas ductais (46,7%) e tipos histológicos raros (50%), e da mesma forma, somente nas pacientes com receptor de estrogênio positivo, que incluiu todas as pacientes com carcinoma lobular, sugerindo o envolvimento dessa região e possivelmente do gene *ROBO1* no desenvolvimento deste tipo de tumor. Porém esses dados precisam de corroboração em análises com amostras de tamanho mais consistente.

As baixas frequências de MI encontradas em nosso trabalho, também semelhantes a outros estudos descritos na literatura, sugerem que embora as instabilidades de microssatélites estejam presentes em carcinomas mamários, elas não estão envolvidas no desenvolvimento desta doença, sendo somente marcadores da instabilidade genômica e consequência dos erros de pareamento dos cromossomos.

9. REFERÊNCIAS

AALTONEN, L.A.; PELTOMÄKI, P.; LEACH, F.S.; SISTONEN, P.; PYLKKÄNEN, L.; MECKLIN, J.P.; JÄRVINEN, H.; POWELL, S.M.; JEN, J.; HAMILTON, S.R. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. **Science**, Washington, v. 260, p. 812-6, 1993.

ABE, Y.; MASUDA, H.; OKUBO, R. Microsatellite instability of each tumor in sporadic synchronous multiple colorectal cancers. **Oncology reports**, Athens, v. 8, p. 299 – 304, 2001.

AHMADIAN M, WISTUBA II, FONG KM, BEHRENS C, KODAGODA DR, SABOORIAN MH, SHAY J, TOMLINSON GE, BLUM J, MINNA JD, GAZDAR AF. Analysis of the *FHIT* gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. **Cancer research**, **Chicago**, v. 57, p. 3664-3668, 1997.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004

ALBERTSON, D. G.; SHERRINGTON, P. D.; RABBITTS, P. H. Localization of polymorphic DNA probes frequently deleted in lung carcinoma. **Human genetics**. Berlin, v. 83, p. 127-132, 1989.

ALBREKTSEN G.; HEUCH I.; HANSEN, S.; KVALE, G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. **British Journal of Cancer**, London, v. 92, p. 167–175, 2005.

ALI, I. U.; LIDEREAU, R.; CALLAHAN, R. Presence of two Members of c-erbA receptor gene family (c-erbA and c-erbA2) in smallest region of somatic homozygosity on chromosome 3p21 – p25 in human breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 81, p. 1815 -1820, 1989.

ALLRED, D.C.; BROWN, P.; MEDINA, D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast cancer research: BCR**. London, v. 6, p. 240–245. 2004

ALTHUIS, M. D.; FERGENBAUM, J. H.; GARCIA-CLOSAS, M.; BRINTON, L. A.; MADIGAN, M. P.; SHERMAN, M. E. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 13, p. 1558–1568, 2004.

ALTUCCI L, GRONEMEYER H. Nuclear receptors in cell life and death. **Trends Endocrinol Metab**, v. 12, 460–468, 2001.

ANBAZHAGAN, R.; FUJII, H. GABRIELSON, E. Microsatellite Instability Is Uncommon in Breast Cancer, **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 5, p. 839-844, 1999.

ANDRÉ, F.; DOMONT, J.; DELALOGUE, S. What can breast cancer molecular sub-classification add to conventional diagnostic tools? Review. **European Society for Medical Oncology**. London, v. 18 (Suppl 9) p. ix33-6, 2007

ARPINO G, BARDOU VJ, CLARK GM, ELLEDGE RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. **Breast Cancer Research**, London, v. 6; 149–156, 2004.

BARROSO, E.; MILNE, R.L.; FERNANDEZ, L.P.; ZAMORA, P.; ARIAS, J.I.; BENITEZ, J.; RIBAS, G. FANCD2 associated with sporadic breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v.27 (9), p.1930–1937, 2006.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. 1988.

BERTUCCI F, FINETTI P, ROUGEMONT J, CHARAFE-JAUFFRET E, CERVERA N, TARPIN C, NGUYEN C, XERRI L, HOULGATTE R, JACQUEMIER J, VIENS P, BIRNBAUM D. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 65(6), p. 2170-8, 2005.

BIÈCHE, I.; CHAMPEME, M. H.; MATIFAS, F.; CROPP, C. R.; CALAHAN, R.; LIDEREAU, R. Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 53, p. 1950-1994, 1993.

BIRNBAUM D, BERTUCCI F, GINESTIER C, TAGETT R, JACQUEMIER J, CHARAFE-JAUFFRET E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **International Journal of Oncology**, Athens, v. 25, p. 249-258, 2004.

BOECKER W, BUERGER H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineage in the human adult breast epithelium: a new progenitor (adult steam) cell concept. **Cell proliferation**, Oxford, v. 36, p. 73-84, 2003.

BRAGA, E.; PUGACHEVA, E.; BAZOV, I. Comparative allelotyping of the short arm of human chromosome 3 in epithelial tumors of four different types. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 454, p. 215–219, 1999.

CAMPIGLIO M, PEKARSKY Y, MENARD S, TAGLIABUE E, PILOTTI S, CROCE CM. FHIT loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. **Cancer Research**, Chicago, v. 59, p. 3866–3869, 1999.

CARTER, C.L.; ALLEN, C.; HENSON, D.E. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. **Cancer**, New York, v. 63, p. 181-187, 1989.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J**, v. 10, p. 940–954, 1996.

CHEN LC, MATSUMURA K, DENG G, KURISU W, LJUNG BM, LERMAN MI, WALDMAN FM, SMITH HS. Deletion of two separate regions on chromosome 3p in breast cancers, **Cancer Research**, Chicago, v. 54 (11), p. 3021-4, 1994.

CHEN, L. C.; KURISU, W.; LIUNG, B. M.; GOLDMAN, E.S.; MOORE, I.I.D.; SMITH, H. S. Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 84, n. 7, p. 506-510, 1992.

CLARKE, M.F.; FULLER, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. **Cell**, Cambridge, v. 124(6), p. 1111- 1115, 2006.

CLIFFORD, S. C.; PROWSE, A. H.; AFFARA, N. A. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumorigenesis. **Genes, chromosomes & cancer**, New York, v. 22, p. 200–209, 1998.

COLDITZ, G. A. Epidemiology of breast cancer: findings from the nurses' health study. The British journal of cancer. **Supplement**, Stockton, v. 15, p. 1480-1489, 1993.

COLES, C. S.; THOMPSON, A. M.; ELDER, P. A.; COHEN, B. B.; MACKENYIE, I. M.; CRANSTON, G.; CHETTY, U.; MACKAY, J.; MAC DONALD, M.; NAKAMURA, Y.; HOYHEIM, B.; STEEL, C. M. Evidence implicating at least two genes on chromosome 17p in breast carcinogenesis. **Lancet**, London, v. 336, p. 761-763, 1990.

COUPIER, I.; COUSIN, P.Y.; HUGHES, D.; LEGOIX-NÉ, P.; TREHIN, A.; SINILNIKOVA, O.M.; STOPPA-LYONNET, D. BAP1 and breast cancer risk. **Familial cancer**. Boston, v. 4(4), p. 273-277, 2005

CROPP, C. S.; LIDEREAU, R.; CAMPBELL, G.; CHAMPEME, M. H.; CALLAHAN, R. Loss of heterozygosity on chromosome 17 and 18 in breast carcinoma. Two additional regions identified. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 7737- 7741, 1990.

DAMMANN, R.; LI, C.; YOON, J. H. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. **Nature Genetic**, New York, v. 25, p. 315–319, 2000.

DENG G, LU Y, ZLOTNIKOV G, THOR AD, SMITH HS. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast cancers. **Science**, Washington, v. 274, p. 2057–2059, 1996.

DH, MABRY M. A phase II study of all-trans retinoic acid puls cisplatin and etoposide in patients with extensive stage small cell lung carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. **Cancer**, New York, v. 83, p.1102-1108, 1998.

DHINGRA K, HORTOBAGYI GN. Critical evaluation of prognostic factors. **Semin Oncol**, v. 23, p. 436-45, 1996.

DONTU, G.; AL-HAJJ, M.; ABDALLAH, W.M.; CLARKE, M.F.; WICHA, M.S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. **Cell proliferation**. Oxford, v. 36 (Suppl. 1), p. 59 -72, 2003.

EDAMATSU H, KAZIRO Y, ITOH H. LUCA15, a putative tumour suppressor gene encoding an RNA-binding nuclear protein, is down-regulated in ras-transformed Rat-1 cells. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, Oxford, v.5, p. 849– 858, 2000.

EINSENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 377-88, 2001.

EL KHOURY M, CHEREL P, BECETTE V et al. Unusual soft-tissue metastasis of an invasive lobular carcinoma mimicking fasciitis. **American journal of roentgenology**, Springfield, v. 182, p. 745–747, 2004.

FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v. 61, p. 759-767, 1990.

FOSTER, K.; PROWSE, A.; VAN DEN BERG, A. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 3, p. 2169–2173, 1994.

FU Q, YAO GY, TANG XL, CHEN LR, ZHENG ZX. Microsatellite instability and allele-specific chromosome 3p deletion in breast cancer and precancerous lesions, **Chinese Journal of Oncology**, Beijing, v. 29 (1), p. 34-40, 2007.

GARCIA-HIGUERA I, TANIGUCHI T, GANESAN S et al. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. **Molecular cell**, Cambridge, v. 7, p. 249–262, 2001.

GATALICA, Z.; LELE, S.M.; RAMPY, B.A.; NORRIS, B.A. The expression of FHIT protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma. **Cancer**. New York, v. 88(6), p. 1378-1383. 2000

GNARRA, J. R.; TORY, K.; WENG Y. Mutation of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. **Nature Genetic**, New York, v. 7, p. 85–90, 1994.

GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDIN S, WINGO P. Cancer statistics 2000. **CA: a cancer journal for clinicians**, New York, v. 50, p. 7-33, 2000.

HAI-TAO, Z.; ZHI-HAI, P.; SHENG, L.; LIN, H. Loss of heterozygosity analyzed by single nucleotide polymorphism array in cancer. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 21, n. 11, p. 6740-6744, 2005.

HANBY, A.M.; KELSELL, D.P.; POTTS, H.W. Association between loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 and morphological attributes of sporadic breast cancer. **International journal of cancer**, New York, v. 88, p. 204–208, 2000.

HARTIKAINEN, J.M.; TUHKANEN, H.; KATAJA, V.; DUNNING, A.M.; ANTONIOU, A.; SMITH, P.; ARFFMAN, A.; PIRSKANEN, M.; EASTON, D.F.; ESKELINEN, M.; UUSITUPA, M.; KOSMA, V.M.; MANNERMAA, A. An autosome-wide scan for linkage disequilibrium-based association in sporadic breast cancer cases in eastern Finland: three candidate regions found. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**. Philadelphia, v. 14(1), p. 75-80, 2005.

HEJNA, J. A.; TIMMERS, C. D.; REIFSTECK, C.; BRUUN, D. A.; LUCAS, L. W.; JAKOBS, P. M.; TOTH-FEJEL, S.; UNSWORTH, N.; CLEMENS, S. L.; GARCIA, D. K.; NAYLOR, S. L.; THAYER, M. J.; OLSON, S. B.; GROMPE, M.; MOSES, R. E. Localization of the Fanconi anemia complementation group D gene to a 200-kb region on chromosome 3p25.3. **American journal of human genetics**, Chicago, v. 66, p. 1540-1551, 2000.

HENDERSON, B. E.; ROSS, R. K.; PIKE, M. C. Toward the primary prevention of cancer. **Science**, Washington, p. 254, p. 1131–1138, 1991.

HENSON D.E.; RIES, L.; FREEDMAN, M.A.; CARRIAGA, M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22.616 cases of breast cancer. **Cancer**, v. 68, p. 2142-2149, 1991.

HIBI K; TAKAHASHI T; YAMAKAWA K; UEDA R; SEKIDO Y; ARIYOSHI Y; SUYAMA M; TAKAGI H Y; NAKAMURA, T. TAKAHASHI, T. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 7, p. 445 - 449, 1992.

HINCK, L. The Versatile Roles of “Axon Guidance” Cues in Tissue Morphogenesis, **Developmental cell**, Cambridge, v. 7(6), p. 783-93, 2004.

HIRANO A, EMI M, TSUNEIZUMI M, UTADA Y, YOSHIMOTO M, KASUMI F, AKIYAMA F, SAKAMOTO G, HAGA S, KAJIWARA T, NAKAMURA Y. Allelic losses of loci at 3p25.1, 8p22, 13q12, 17p13.3, and 22q13 correlate with postoperative recurrence in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, Denville, v.7, p. 876-882, 2001.

HOLZEL M, VAN DIEST PJ, BIER P et al. FANCD2 protein is expressed in proliferating cells of human tissues that are cancer-prone in Fanconi anemia. The **Journal of pathology**, London, v. 201, p.198–203, 2003.

HOUGHTALING S, TIMMERS C, NOLL M et al. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. **Genes & development**, New York, v. 17, p. 2021–2035, 2003.

HU Z, FAN C, OH DS, MARRON JS, HE X, QAQISH BF, LIVASY C, CAREY LA, REYNOLDS E, DRESSLER L, NOBEL A, PARKER J, EWEND MG, SAWYER LR, WU J, LIU Y, NANDA R, TRETIAKOVA M, RUIZ ORRICO A, DREHER D, PALAZZO JP, PERREARD L, NELSON E, MONE M, HANSEN H, MULLINS M, QUACKENBUSH JF, ELLIS MJ, OLOPADE OI, BERNARD PS, PEROU CM. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics**, London, v. 27 (7), p. 96, 2006.

HUANG, Z.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A.; HUNTER, D.J.; MANSON, J.E.; ROSNER, B.; SPEIZER, F.E.; HANKINSON, S.E. Waist circumference, waist:hip ratio, and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study. **American journal of epidemiology**, Baltimore, v. 150, n.12, p.1316-24, 1999.

HUEBNER, K.; GARRISON, P. N.; BARNES, L. D. The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. **Annual review of genetics**, Palo Alto, v. 32, p. 7–31, 1998.

HUIPING C, JONASSON JG, AGNARSON BA, SIGBJORNSDOTTIR BI, HUEBNER K, INGVARSSON S. Analysis of the fragile histidine triad (FHIT) gene in lobular breast cancer. **European journal of cancer**, Oxford, v. 36, p. 1552–1557, 2000.

IARC: World Health Organization International Agency for Research on Cancer. Monographs: Programme finds combined estrogen-progestogen contraceptives and menopausal therapy are carcinogenic to humans. July 29, 2005. Disponível em: www.iarc.fr/ENG/Press_Releases/pr167a.html. Acesso em: Janeiro de 2008.

ILIOPOULOS O, KIBEL A, GRAY S, KAELIN WG, JR. Tumor suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. **Nature medicine**; New York, v. 1, p. 822-826, 1995.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>> Acesso em: Janeiro de 2008.

INGVARSSON S, SIGBJORNSDOTTIR BI, HUIPING C, JONASSON JG, AGNARSSON BA. **Cancer detection and prevention**, New York, v. 25, p. 292–298, 2001.

INGVARSSON, S. FHIT alterations in breast cancer. **Seminars in cancer biology**. London, v. 11, p. 361-366, 2001.

INGVARSSON, S. Genetics of breast cancer. **Drugs Today**. Barcelona, v. 40, p. 991-1002, 2004.

INNES, K. E.; BYERS, T. E. Smoking during pregnancy and breast cancer risk in very young women (United States). **Cancer Causes Control**, Oxford, v. 12, p. 179-185, 2001

KAELIN, W. G.; MAHER, E. R. The VHL tumour-suppressor gene paradigm. **Trends in Genetic**, Amsterdam, v. 14, p. 423–426, 1998.

KAHLENBORN C, MODUGNO F, POTTER DM, SEVERS WB. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis. **Mayo Clin Proc**, v. 81(10), p. 1290-1302, 2006.

KALEMKERIAN GP, JIROUTEK M, ETTINGER DS, DORIGHI JA, JOHNSON KAMANGAR, F., DORES, G.M., AND ANDERSON, W.F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v.24, p.2137-2150, 2006.

KETTERHAGEN JP, QUAKENBUSH SR, HAUSHALTER RA. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast. **Surgery, gynecology & obstetrics**, Chicago, v. 158, p.120-3, 1984.

KIM M, KATAYOSE Y, LI Q, RAKKAR AN, LI Z, HWANG SG, KATAYOSE D, TREPEL J, COWAN KH, SETH P. Recombinant adenovirus expressing Von Hippel-Lindau-mediated cell cycle arrest is associated with the induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. **Biochem Biophys Res Commun**, San Diego, v. 253, 672–677, 1998.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 68, p. 820 – 823, 1971.

KOLLIAS, J.; MAN, S.; MARAFIE, M.; CARPENTER, K.; PINDER, S.; ELLIS, I.O.; BLAMEY, R.W.; CROSS, G.; BROOK, J.D. Loss of heterozygosity in bilateral breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 64, p. 241–251, 2000.

KONDO, K.; KAE LIN, W.G. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. **Experimental cell research**. Orlando, v. 264, p.117-125, 2001.

KUMAR, N.B.; CANTOR, A.; ALLEN, K.; COX, C.E. Android obesity at diagnosis and breast carcinoma survival: Evaluation of the effects of anthropometric variables at diagnosis, including body composition and body fat distribution and weight gain during life span, and survival from breast carcinoma. **Cancer**, New York, v. 88, n.12, p. 2751-7, 2000.

LAM PK, TO EWH, CHAN ESY, LIEW CT, LUNG IWH, KING WK. In vitro inhibition of head and neck cancer-cell growth by human recombinant interferon α and 13-cis retinoic acid. **British journal of biomedical science**, London, v. 58, p.226-229, 2001.

LAMBE M, HSIEH CC, CHAN HW, EKBOM A, TRICHOPOULOS D, ADAMI HO. Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population-based study in Sweden. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 38, p. 305-311, 1996.

LATIF F, TORY K, GNARRA J, YAO M, DUH F-M, ORCUTT ML, STACKHOUSE T, KUZMIN I, MODI W, GEIL L, SCHMIDT L, ZHOU F, LI H, WEI MH, CHEN F, GLENN G, CHOYKE P, WALTHER MM, WENG Y, DUAN D-SR, DEAN M, GLAVAC D, RICHARDS FM, CROSSEY PA, FERGUSON-SMITH MA, LE PASLIER D, CHUMAKOV I, COHEN D, CHINAULT AC, MAHER ER, LINEHAN WM, ZBAR B AND LERMAN ML. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. **Science**, Washington, v. 260, p.1317-1320, 1993.

LERMAN MI, MINNA JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. **Cancer Research**, Chicago, v. 60, p. 6116–6133, 2000.

LEUNG RS, BISWAS SV, DUNCAN M, RANKIN S. Imaging features of von Hippel-Lindau disease. **Radiographics**, Oak Brook, v. 1, p. 65-79, 2008

LINKSVILLADSEN, R.; FRIDRIKSDOTTIR, A.J.; RØNNOV-JESSEN, L.; GUDJONSSON, T.; RANK, F.; LABARGE, M.A.; BISSELL, M.J.; PETERSEN, O.W. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. **The Journal of cell biology**. New York, v. 177(1), p. 87-101, 2007.

LIPPMANN SM, MEYSKENS FL. Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the skin with isotretinoin. **Annals of Internal Medicine**, v.107, p.499, 1987.

LONERGAN, K.M.; ILIOPOULOS, O.; OHH, M.; KAMURA, T.; CONAWAY, R.C.; CONAWAY, J.W.; KAE LIN, W.G. JR. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. **Molecular and cellular biology**. Washington, D.C., v. 18, p. 732-741. 1998

LOURO, I. D.; LLERENA JR., J. C.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. **Genética molecular do câncer**. 2 ed., São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

LUNDBERG, C.; SKOOG, L.; CAVENEE, W. K.; NORDENSKJOLD, M. Loss of heterozygosity in human ductal breast carcinoma indicates a recessive mutation on chromosome 13. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, p. 2372-2376, 1987.

MACKAY, J.; ELDER, P.A.; PORTEOUS, D. J.; STEEL, C. M.; HAWKINS, R. A.; GOING, J.J.; CHETTY, U. Partial deletion of chromosome 11p in breast cancer, brain tumors, leukemia, lung, laryngeal and adrenal cortical carcinoma. **Cancer**, New York , v. 41, p. 2055-2064, 1988.

MAITRA, A.; WISTUBA, I.I.; WASHINGTON, C.; VIRMANI, A. K.; ASHFAQ, R.; MILCHGRUB, S.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. **The American journal of pathology**, Philadelphia, v. 159, n. 1, p. 119-30, 2001.

MAN S, ELLIS IO, SIBBERING M, BLARNEY RW, BROOK JD. High levels of allele loss at the FHIT and ATM genes in non-comedo ductal cancer in situ and grade I tubular invasive breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 56, p. 5484–5489, 1996.

MANJER, J.; MALINA, J.; BERGLUND, G.; BONDESON, L.; GARNE, J. P.; JANZON, L. Increased incidence of small and well-differentiated breast tumours in post-menopausal women following hormone-replacement therapy. **International journal of cancer**, New York, v. 92, p. 919-922, 2001.

MANSOURI, A.; GOODFELLOW, P. N.; KEMLER, R. Molecular cloning and chromosomal localization of the human cell adhesion molecule uvomorulin (UVO). **Cytogenet. Cell Genet**, v. 46, p. 655, 1987.

MARTINEZ, A.; WALKER, R. A.; SHAW, J. A.; DEARING, S. J.; MAHER, E. R.; LATIF, F. Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features, **Molecular pathology**, London, v. 54, n. 5, p. 300–306, 2001.

MARTINEZ, M. A. R. Estudo das alterações do microssatélites D6S251 e D6S252 no carcinoma basocelular esporádico. **Faculdade de medicina da universidade de São Paulo**, São Paulo, 2006.

MATSUMOTO S, MINOBE K, UTADA Y, FURUKAWA K, ONDA M, SAKAMOTO G, KASUMI F, NAKAMURA Y, EMI M. Loss of heterozygosity at 3p24-p25 as a prognostic factor in breast cancer. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.152, p.63-69, 2000.

MAXWELL, P.H.; WIESENER, M.S.; CHANG, G.W.; CLIFFORD, S.C.; VAUX, E.C.; COCKMAN, M.E.; WYKOFF, C.C.; PUGH, C.W.; MAHER, E.R. RATCLIFFE, P.J. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen- dependent proteolysis. **Nature**, London, v. 399, p. 271-275, 1999.

MILLER, B.J.; WANG, D.; KRAHE, R.; WRIGHT, F.A. Pooled analysis of loss of heterozygosity in breast cancer: a genome scan provides comparative evidence for multiple tumor suppressors and identifies novel candidate regions. **American journal of human genetics**. Baltimore, v. 73(4), p. 748-767, 2003.

MIYAKIS, S.; SPANDIDOS, D.A.; Allelic loss in breast cancer. *Cancer detection and prevention*, New York, v. 26(6), p. 426-434, 2002.

MOINFAR, F.; MAN, Y.G.; BRATTHAUER, G.L.; RATSCHEK, M.; TAVASSOLI, F. A. Genetic abnormalities in mammary ductal intraepithelial neoplasia-flat type ("clinging ductal carcinoma in situ"): a simulator of normal mammary epithelium. **Cancer**, New York, v. 88, p. 2072–2081, 2000.

MORRISON, A. S. Screening for Cancer of the Breast. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 2, n. 1, p. 244—55, 1993.

MOURTADA-MAARABOUNI, M; SUTHERLAND, L.C ; MEREDITH, J.M; WILLIAMS, G.T. Simultaneous acceleration of the cell cycle and suppression of apoptosis by splice variant delta-6 of the candidate tumour suppressor LUCA-15/RBM5, **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, Oxford, v. 8, p. 109–119, 2003.

MULLAN, P.B.; MILLIKAN, R.C. Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, 2007.

NAVARRETE, M.A; MAIER, C.M.; FALZONI, R.; QUADROS, L.G; LIMA, G.R; BARACAT, E.C; NAZÁRIO, A.C. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Breast Cancer Research**, London, v. 7, p. 306–313, 2005.

NEUZIL, J.; STANTIC, M.; ZOBALOVA, R.; CHLADOVA, J.; WANG, X.; PROCHAZKA, L.A.C.; DONG, L.A; ANDERA L.D, RALPH, S.J. Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: What's in the name? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, p. 855–859, 2007.

OH JJ, WEST AR, FISHBEIN MC, SLAMON DJ. A candidate tumour suppressor gene, H37, from the human lung cancer tumour suppressor locus 3p21.3. **Cancer Research**, Chicago, v.62, p. 3207–3213, 2002.

OLDENBURG RA, MEIJERS-HEIJBOER H, CORNELISSE CJ, DEVILEE P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. Boca Raton, v. 63, p. 125–149, 2007.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. **The global picture European journal of cancer**, Oxford, v. 37, p. 4-66, 2001.

PAUSE, A.; LEE, S.; LONERGAN, K.M.; KLAUSNER, R.D. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D.C, v. 95, p. 993-998, 1998.

PERERA, F. P.; ESTABROOK, A.; HEWER, A.; CHANNING, K.; RUNDLE, A.; MOONEY, L. A.; WHYATT, R.; PHILLIPS, D. H. Carcinogen-DNA adducts in human breast tissue. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 4, p. 233-238, 1995.

PEREZ-ESCAMILLA, R; GUERRERO, M. L. Epidemiology of breastfeeding: advances and multidisciplinary applications. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 554, p. 45–59, 2004.

PEREZ-ORDOÑEZ, B.; BEAUCHEMIN, M. and JORDAN, R.C.K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Clinical Pathology**, 59: 445-453, 2006.

PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE O, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LONNING PE, BØRRESEN-DALE AL, BROWN PO, BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, v. 406, p. 747-752, 2000.

PFAHL, M. Vertebrate receptors: molecular biology, dimerization and response elements. **Semin Cell Biol**, v. 5, p. 95–103, 1994.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 117(11), p. 3155-3163, 2007.

POLYAK, K.; HAHN, W.C. Roots and stems: Stem cells in cancer. **Nature Medical**, v.12, p. 296–300, 2006.

QIFENG YANG, Q.; SAKURAI,T.; KAKUDO, K. Minireview: Retinoid, retinoic acid receptor β and breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 76, p. 167-173, 2002.

RICHARDS RI, SUTHERLAND GR. Heritable unstable DNA sequences. **Nature Genetics**, New York, v. 1, p. 7-9, 1992.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ : Canadian Medical Association journal**, Ottawa, v 174(3), p. 10.1503, 2006.

ROYLANCE, R.; GORMAN, P.; HARRIS, W. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 59, p. 1433–1436, 1999.

RUSH EB, CALVANO JE, VAN ZEE KJ, ZELENETZ AD, BORGEN PI. MICROSATELLITE INSTABILITY IN BREAST CANCER. **Annals of Surgical Oncology**, New York, v. 4(4), p. 310-315, 1997.

RUSSO IH, RUSSO J: Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. **Environ Health Perspect**, v.104, p. 938-967, 1996.

RUSSO J, TAY LK, RUSSO IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 2, p. 5-73, 1982.

RUSSO, J.; MORAL, R.; BALOGH, G.A.; MAILO, D.; IRMA, RUSSO, I, H. The protective role of pregnancy in breast cancer, **Cancer Research**, Chicago, v. 7, p. 131-142, 2005

SATO, T.; TANIGAMI, A.; YAMAKAWA, K.; KASUMI, F.; SAKAMOTO, G.; NAKAMURA, Y. Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 50, p. 7184 – 7189, 1990.

SAVANIS G, SIMATOS G, TZAIDA O et al. Gastrointestinal tract metastasis as first presentation of breast cancer. **Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology**, Athens, v. 11, p. 79-81, 2006;

SCARFF, R.; TORLONI, F. Histological typing of breast tumors. International histological classification of tumors, **World Health Organization**, Geneva, v. 2, p.20, 1968.

SCRABLE, H. J.; SAPIENZA, C.; CAVENEE, W. K. Genetic and epigenetic losses of heterozygosity in cancer predisposition and progression. **Adv. Cancer Research**, Chicago, v. 54, p. 25-62, 1990.

SHIPITSIN M.; CAMPBELL, L.L.; ARGANI P.; WEREMOWICZ, S.; BLOUSHTAIN-QIMRON, N.; YAO, J.; NIKOLSKAYA, T.; SEREBRYISKAYA, T.; BEROUKHIM, R.; HU, M.; HALUSHKA, M.K.; SUKUMAR, S.; PARKER, L.M.; ANDERSON, K.S.; HARRIS, L.N.; GARBER, J.E.; RICHARDSON, A.L.; SCHNITT, S.J.; NIKOLSKY, Y.; GELMAN, R.S.; POLYAK, K. Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity, **Cancer Cell**, Cambridge, v. 11(3), p. 259-73, 2007.

SHIVAKUMAR, L.; MINNA, J.; SAKAMAKI, T.; PESTELL, R.; WHITE, M.A. The RAS1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. **Molecular and Cell Biology**, Washington, v.22, p. 4309-4318, 2002.

SILVA JM, DOMÍNGUEZ G, GONZÁLEZ-SANCHO JM, GARCÍA JM, SILVA J, GARCÍA-ANDRADE C, NAVARRO A, MUÑOZ A, BONILLA F. Expression of Thyroid Hormone Receptor/erbA Genes is altered in Human Breast Cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21(27), p. 4307-4316, 2002.

SINGLETARY SE, PATEL-PAREKH L, BLAND KI. Treatment trends in early-stage invasive lobular carcinoma: a report from the National Cancer Data Base. **Annals of surgery**. Philadelphia, v. 242, 281–289, 2005.

SORLIE T, WANG Y, XIAO C, JOHNSEN H, NAUME B, SAMAHA RR, BORRESEN-DALE AL. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, London, v. 7, p. 127, 2006.

SOURVINOS G, MIYAKIS S, LILOGLOU TL, FIELD JK, SPANDIDOS DA. Von Hippel-Lindau tumour suppressor gene is not involved in sporadic human breast cancer. **Tumour biology**, Tokyo, v. 22 (3), p. 131-136, 2001.

SOZZI, G.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. FHIT in human cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 74, p. 141–66, 1998.

SPORN MB, ROBERTS AB, GOODMAN DS: The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine, **Annals of Internal Medicine**, New York, v. 121 (1), p. 78, 1994.

STRICKLAND, P; SHIN, G.C.; PLUMP, A.; TESSIER-LAVIGNE, M.; HINCK, L. Slit2 and netrin 1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis, **Development**, Cambridge, v. 133, p. 823–832, 2006.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutation research**, Amsterdam, v. 402, p. 7-14, 1998.

SUNDARESAN, V.; CHUNG, G.; HEPPELL-PARTON, A. Homozygous deletions at 3p12 in breast and lung cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 17, p. 1723–1729, 1998a.

SUNDARESAN, V.; ROBERTS, I.; BATEMAN, A. The *DUTT1* gene, a novel NCAM family member is expressed in developing murine neural tissues and has an unusually broad pattern of expression. **Molecular and cellular neurosciences**, San Diego, v. 11, p. 29–35, 1998b.

TAI, A.L.; MAK, W.; NG, P.K.; CHUA, D.T.; NG, M.Y.; FU, L.; CHU, K.K.; FANG, Y.; QIANG SONG, Y.; CHEN, M.; ZHANG, M.; SHAM, P.C.; GUAN, X.Y. High-throughput loss-of-heterozygosity study of chromosome 3p in lung cancer using single-nucleotide polymorphism markers. **Cancer research**. Baltimore, v. 66(8), p. 4133-4138.

TANG, X.L.; YAO, G.Y.; CHEN, L.R.; YANG, Z.R; LI, S.L. Loss of heterozygosity on chromosome 3p in breast cancer and precancerous lesion. **Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]**. Beijing, v. 44(19), p. 1314-1317. 2006.

TAY LK, RUSSO J. Formation and removal of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-nucleic acid adducts in rat mammary epithelial cells with different susceptibility to carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 2, p.1327-1333, 1981.

TERRY, P.; MILLER, A.; ROHAN, T. Cigarette smoking and breast cancer risk: a long latency period? **International journal of cancer**, New York, v. 100, p. 723-728, 2002.

THEILLET, C.; ADNANE, J.; SZEPEKOWSKI, P.; SIMON, M.P.; JEANTEUR, P.; BIRNBAUM, D.; GAUDRAY, P. Bcl-1 participates in the 11q13 amplification found in breast carcinomas. **Cancer Research**, Chicago, v. 46, p. 4776-4781, 1986.

THIAGALINGAM, S.; FOY, R.L.; CHENG, K.; LEE, H.J.; THIAGALLINGAM, A.; PONTE, J.F. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: Molecular basis of its occurrence. **Current opinion in oncology**, Philadelphia, v. 14, p. 65 -72, 2002.

THIBODEAU SN, BREN G, SCHAID D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**, Washington, v. 260, p. 816-819, 1993.

TIMMER, T.; TERPSTRA, P.; VAN DEN BERG, A.; VELDHUIS, P. M. J. F.; ELST, A. T.; VOUTSINAS, G.; HULSBEEK, M. M. F.; DRAAIJERS, T. G.; LOOMAN, M. W. G.; KOK, K.; NAYLOR, S. L.; BUYS, C. H. C. M. A comparison of genomic structures and expression patterns of two closely related flanking genes in a critical lung cancer region at 3p21.3. *European journal of human genetics*, **London**, v.7, p.478-486,1999.

TROESTER MA, HOADLEY KA, SØRLIE T, HERBERT BS, BORRESEN-DALE AL, LONNING PE, SHAY JW, KAUFMANN WK, PEROU CM. Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 64(12), p. 4218-26, 2004.

VAN DE VIJER, M. J.; NUSSE, R. The molecular biology of breast câncer. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1072, p. 33-50, 1991.

VAN DER GROEP, P.; HOELZEL, M.; BUERGER, H.; JOENJE, H.; WINTER, J.P.; VAN DIEST, P.J. Loss of expression of FANCD2 protein in sporadic and hereditary breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 107, p.41–47, 2008.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, London, v. 7(9), p. 659-72, 2007.

VAURY, C.; LAINE, R.; NOGUIEZ, P.; DE COPPET, P.; JAULIN, C.; PRAZ, F.; POMPON, D.; AMOR-GUÉRET, M. Human glutathione S-transferase CYP1A1*2A null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription. **Cancer Research**, Chicago, v. 55, p. 5520-5523, 1995.

VILLADSEN, R. ;FRIDRIKSDOTTIR, A.J.; RONNOV-JESSEN, L.; GUDJONSSON, T.; RANK, F.; LABARGE, M. A.; BISSELL, M. J.; PETERSEN, O.W. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. **The Journal of cell biology**, New York , v. 177(1), p. 87-101, 2007.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. **Trends in Genetic**, Amsterdam, v. 9, p.138 -141, 1993.

WANG ZC, LIN M, WEI LJ, LI C, MIRON A, LODEIRO G, HARRIS L, RAMASWAMY S, TANENBAUM DM, MEYERSON M, IGLEHART JD, RICHARDSON A. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. **Cancer Research**, Chicago, v. 64(1), p. 64-71, 2004.

WEINBERG, RA. Tumor suppressor genes. **Science**, Washington, v. 254, p. 1138-1146, 1991

WHALEY, J.M.; NAGLICH, J.; GELBERT, L.; HSIA, Y.E.; LAMIELL, J.M.; GREEN, J.S.; COLLINS, D.; NEUMANN, H.P.; LAIDLAW, J.; LI, F.P. Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. **American journal of human genetics**. Baltimore, v. 55, p. 1092-1102, 1994.

WIJNHOVEN BP, DINJENS WN, PIGNATELLI M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. **The British journal of surgery**, Chichester, v. 87 (8), p. 992-1005, 2000.

WISTUBA, II.; BEHRENS, C.; VIRMANI, A.K.; MELE, G.; MILCHGRUB, S.; GIRARD, L.; FONDON, J.W. 3RD; GARNER, H.R.; MCKAY, B.; LATIF, F.; LERMAN, M.I.; LAM, S.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D. High resolution chromosome 3p allelotyping of lung cancer and preneoplastic bronchial epithelium reveals multiple sites of 3p allele loss and frequent breakpoints in the 600 kb 3p21.3 region. **Cancer research**. Baltimore, v. 60, p. 1949–1960, 2000.

XU X-C, SNEIGE N, LIU X, NANDAGIRI R, LEE JJ, LUKMANJI F, HORTOBAGYI G, LIPPMAN SM, DHINGRA K, LOTAN R. Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor _ messenger RNA level during breast carcinogenesis. **Cancer Research**, Chicago, v. 57, p. 4992–4996, 1997.

YAMAMOTO, N.; KUROIWA, T.; KATAKURA, A.; SHIBAHARA, T.; CHOUDHURY, C. Loss of heterozygosity (LOH) on chromosomes 2q, 3p and 21q in Indian oral squamous cell carcinoma. **The Bulletin of Tokyo Dental College**. Tokyo, v. 48(3), p. 109-117, 2007.

YANG Q, MORI I, SHAN L, NAKAMURA M, NAKAMURA Y, UTSUNOMIYA H, YOSHIMURA G, SUZUMA T, TAMAKI T, UMEMURA T, SAKURAI T, KAKUDO K. Biallelic inactivation of retinoic acid receptor _2 gene by epigenetic change in breast cancer. **American journal of human genetics**, Chicago, v. 58, p. 299–303, 2001b.

YANG Q, YOSHIMURA G, SAKURAI T, NAKAMURA M, NAKAMURA Y, SHAN L, SUZUMA T, TAMAKI T, UMEMURA T, MORI I, KAKUDO K. Allelic loss of chromosome 3p24 correlates with tumor progression rather than with retinoic acid

receptor α_2 expression in breast cancer, **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 70, p. 39–45, 2001a.

YANG, Q.; YOSHIMURA, G.; SAKURAI, I.M.T.; KAKUDO, K. Chromosome 3p and breast cancer, **American journal of human genetics**, Chicago, v. 47(9), p. 453-459, 2002.

YEE, J.C.; ROODI, N. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 54, p. 1641-1644, 1994.

YU, K.; LEE, C.H.; TAN, P.H.; TAN, P.. Conservation of breast cancer molecular subtypes and transcriptional patterns of tumor progression across distinct ethnic populations. **Clinical Cancer Research**, Denville, v.10, p. 5508–5517, 2004.

ZABAROVSKY, E.R; LERMAN, M.I.; MINNA, J.D. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, p. 6915-6935, 2002.

ZHIGANG C. WANG, MING LIN, LEE-JEN WEI, CHENG LI, ALEXANDER MIRON, GABRIELLA LODEIRO, LYNDSEY HARRIS, SRIDHAR RAMASWAMY, DAVID M. TANENBAUM, MATTHEW MEYERSON, JAMES D. IGLEHART, AND ANDREA RICHARDSON. Loss of Heterozygosity and Its Correlation with Expression Profiles in Subclasses of Invasive Breast Cancers, **Cancer Research**, Chicago, v. 64, p. 64-71, 2004.

ZIA MK, RMALI KA, WATKINS G, MANSEL RE, JIANG WG. The expression of the von Hippel-Lindau gene product and its impact on invasiveness of human breast cancer cells. **International journal of molecular medicine**, Athens, v. 20 (4), p. 605-611, 2007.

10. APÊNDICE

Distribuição de homozigotos, heterozigotos, LOHs, MIs e casos não amplificados nas amostras de carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, tipos histológicos raros e com histologia desconhecida

Paciente	CARCINOMA DUCTAL INVASOR						
	D3S1300	D3S1274	D3S1581	D3S1079	D3S1263	D3S1286	D3S1307
1	-	HET	HET	-	LOH	LOH	HET
2	-	HOMO	HET	HET	HET	HET	HOMO
3	HET	HET	HET	HOMO	HET	HET	LOH
4	HET	LOH	-	-	-	-	-
5	HET	HET	HET	LOH	HET	HET	LOH
6	HET	HOMO	HET	LOH	HET	HET	-
7	LOH	HET	HET	HET	HET	LOH	LOH
8	LOH	LOH	LOH	-	-	-	-
9	MI	HOMO	-	LOH	HET	MI	LOH
10	HET	HET	HET	HET	HET	HET	HET
11	HET	HOMO	LOH	-	HET	HET	HET
12	HET	HOMO	HET	HET	HOMO	HET	-
13	HOMO	HET	HET	LOH	HET	LOH	HET
14	HET	-	HET	HOMO	HOMO	HET	HET
15	HET	HOMO	HET	HET	HET	HET	HET
16	HOMO	HOMO	HOMO	HET	LOH	HET	HET
17	HET	-	HET	-	LOH	LOH	-
18	HOMO	HOMO	HET	HET	HOMO	HET	HET
19	HET	HOMO	HET	HET	HET	HET	HET
20	HET	HET	HET	HET	HET	HET	LOH
21	LOH	-	HET	HOMO	HET	HOMO	HET
22	HET	HOMO	HET	HOMO	HOMO	LOH	LOH
23	HET	HOMO	HET	HET	HET	HET	HET
24	HOMO	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
25	MI	HOMO	HET	MI	MI	-	-
26	MI	LOH	LOH	LOH	HET	HET	MI
27	HET	HET	HET	HET	HOMO	HET	HET
28	HET	HET	HET	HET	HET	-	-
29	HOMO	HOMO	HET	HOMO	HET	HET	HOMO
30	HET	LOH	LOH	-	HOMO	-	HOMO
31	HET	HOMO	LOH	HET	LOH	LOH	HOMO
32	HET	-	HET	HOMO	-	HET	LOH
33	-	HOMO	HOMO	-	HET	-	-
34	HET	LOH	HET	HOMO	HET	LOH	-
35	HET	HET	LOH	-	MI	LOH	LOH
36	HOMO	HOMO	HET	HET	HET	HET	-
37	-	HET	HET	-	-	HET	LOH
38	HET	LOH	LOH	HET	HET	HET	-
39	HOMO	HOMO	-	-	HET	HET	HOMO
40	LOH	HOMO	HET	LOH	HET	HOMO	HET
41	HET	HOMO	HOMO	LOH	HOMO	-	HET

42	HET	HOMO	HET	HOMO	HET	HET	HOMO
43	HOMO	HET	HET	HET	HET	HOMO	-
44	HOMO	HOMO	HOMO	HOMO	HET	HET	-
45	-	-	HET	-	HOMO	-	HOMO
46	LOH	LOH	HET	MI	HET	HET	-
47	HET	HET	HET	HOMO	HET	HET	LOH
48	-	HOMO	LOH	HOMO	-	-	-
49	LOH	HOMO	LOH	LOH	HET	LOH	HET
50	LOH	HET	LOH	-	-	-	LOH
51	LOH	LOH	HOMO	-	HET	HET	LOH
52	HET	HOMO	HET	-	-	LOH	-
53	HET	HET	HET	-	HET	HET	MI
54	HET	HOMO	HET	-	-	HET	HET
55	LOH	HET	LOH	-	HOMO	LOH	LOH
56	-	HOMO	HOMO	-	MI	-	HET
57	HOMO	HET	HOMO	-	HOMO	HET	HOMO
58	HOMO	HOMO	HET	-	HET	HET	-
59	LOH	HOMO	LOH	-	-	-	-
60	HET	HET	HET	-	-	-	-
61	HET	LOH	HET	-	HOMO	-	HET
62	LOH	LOH	LOH	-	-	-	HET
63	-	-	HET	-	HET	LOH	-
64	-	-	-	-	HET	HET	-
65	MI	HOMO	LOH	-	-	LOH	-
66	-	HET	LOH	-	HOMO	HOMO	-
67	HET	HET	HET	-	HET	HET	-
68	HOMO	HOMO	HET	-	LOH	HET	-
69	-	HET	HET	-	-	-	-
70	-	HOMO	HOMO	-	HET	LOH	-
71	-	HET	HET	-	HET	HET	LOH
72	-	-	HET	-	-	-	-
73	-	LOH	HET	-	LOH	LOH	HOMO
74	HET	HOMO	-	-	HOMO	-	LOH
75	-	HOMO	HOMO	-	HET	HET	HET
76	-	HOMO	HOMO	-	HET	HET	HET
77	-	HET	LOH	-	HET	HET	LOH
78	HET	-	-	-	HET	HET	HOMO
79	-	HOMO	HET	-	HOMO	-	HET
80	HET	HET	HOMO	-	-	-	HET
81	HET	-	-	-	HET	HET	HOMO
82	HET	LOH	HOMO	-	-	-	-
83	-	HET	LOH	-	-	-	-
84	-	HOMO	HET	-	-	HOMO	HOMO
85	HOMO	HET	HET	-	-	-	HET
86	LOH	HET	HET	-	-	HOMO	-
87	-	LOH	LOH	-	HOMO	-	-
88	-	HET	LOH	-	-	-	-
89	-	HOMO	HET	-	-	-	-
90	-	HOMO	HET	-	HOMO	-	HET
91	-	HOMO	HET	-	-	-	HET

92	-	HOMO	LOH	-	-	-	HET
93	-	-	HET	-	-	HOMO	-
94	LOH	HET	-	-	LOH	LOH	HOMO
95	-	-	LOH	-	-	-	LOH
96	HET	-	LOH	-	-	-	LOH
97	HET	HET	HET	-	HET	-	HET
98	LOH	HOMO	HET	-	LOH	LOH	-
99	HET	-	HET	HET	HOMO	HET	HOMO
100	HET	HOMO	HET	HOMO	-	HOMO	HET
101	HET	-	HET	HOMO	HET	HET	LOH
102	LOH	-	LOH	HOMO	LOH	LOH	LOH
103	HET	-	HET	HET	HET	HET	LOH
104	HET	-	LOH	HOMO	LOH	LOH	LOH
105	HET	-	LOH	-	HET	HET	HET
106	LOH	HOMO	HOMO	HOMO	-	LOH	HET
107	-	-	-	HET	-	-	LOH
108	-	-	-	HET	-	-	MI
109	-	-	LOH	HOMO	HET	HET	LOH
110	HET	-	HOMO	HOMO	HET	HET	HET
111	HOMO	HOMO	HET	HET	HET	HET	HET
112	HOMO	-	-	LOH	-	-	LOH
113	HOMO	-	-	LOH	-	-	LOH
114	HOMO	-	-	LOH	-	-	-
115	HOMO	-	-	-	-	-	LOH

CARCINOMA LOBULAR INVASOR

116	HET	HOMO	HET	HOMO	HET	HET	LOH
117	HOMO	-	LOH	HOMO	LOH	HET	HET
118	HOMO	LOH	LOH	HOMO	LOH	LOH	LOH
119	LOH	HET	HET	HET	HET	HET	-
120	HET	LOH	HOMO	HET	HET	HET	HET
121	HOMO	-	HET	LOH	-	-	HET
122	LOH	HOMO	HET	-	HET	HET	HET
123	-	LOH	-	-	HET	HOMO	LOH
124	HET	LOH	HET	-	-	-	HET
125	HET	HET	HOMO	-	HET	HOMO	-
126	-	-	HET	-	HET	HET	-
127	-	LOH	HET	-	-	-	-
128	-	LOH	HOMO	-	LOH	HET	LOH

TIPOS HISTOLÓGICOS RAROS

129	HET	HOMO	HET		HET	HET	HET
130	-	HOMO	MI	-	HOMO	-	LOH
131	HET	HET	HET	-	HET	HET	LOH
132	-	-	LOH	-	-	-	-
133	HET	HET	HET	-	HET	HET	HET
134	HET	HET	HOMO	HOMO	HOMO	LOH	HOMO
135	-	LOH	HET	-	HOMO	-	-
136	HET	HET	LOH	-	-	HET	-
137	-	HOMO	HET	-	-	-	-
138	HET	HOMO	HET	HET	HET	HET	HOMO

TIPO HISTOLÓGICO DESCONHECIDO							
139	MI	LOH	MI	LOH	MI	MI	-
140	HOMO	HOMO	HET	-	HET	HET	-
141	-	HET	HET	-	LOH	LOH	-
142	LOH	-	-	-	HET	LOH	-

Legenda: HOMO: homozigoto; HET: heterozigoto; LOH: perda de heterozigose; MI: instabilidade de microssatélite; - ausência de resultado.

11. ANEXO I

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

ANEXO II

QUESTIONÁRIO PESSOAL

- 1- Registro hospitalar: _____
- 2- Sexo: () M () F; Peso atual (kg): _____ ; Altura: _____
- 3- A qual grande grupo étnico você pertence ?
Negróide () Caucasóide () Asiático () Indígena () Outros ()
- 4- Idade: _____
- 5- Local de nascimento: Paraná ? () sim () não
Se não: Que região brasileira ? Norte () Sul () Nordeste () Centro-Oeste () Sudeste ()
- 6- Qual o seu grau de instrução?
() analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto
() 2º grau completo () técnico () profissional () superior

Histórico Tabagista

- 12- Você fuma atualmente? () sim () não
- 13- Se NÃO, mas já fumou, há quanto tempo parou de fumar?
a) () 0-5 anos b) () 5-10 anos c) () >10
- 14- Quanto você fuma/fumava por dia ? () menos de ½ maço
() de meio a 1 maço
() mais de um maço
(quantos: _____)
- 15- Você convive/conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?
a) () sim b) () não

Histórico de Etilismo

- 16- Você consome/consumiu bebidas alcóolicas com frequência? () sim () não
- 17- Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?

Histórico hormonal e reprodutivo

28- Idade da primeira menstruação (menarca): _____

29- Idade da última menstruação (menopausa): _____

30- Sua menstruação é/era : ☐ regular ☐ irregular

31- Teve abortos espontâneos? ☐ sim Quantos: _____ ☐ não

32- Teve filhos? ☐ sim Quantos: _____ ☐ não

33- Qual sua idade quando engravidou pela primeira vez? _____

34- Usou ou usa pílulas anticoncepcionais?

☐ sim Por quanto tempo: _____ ☐ não